UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1936-1937. — N° 1

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ÉLIMINATION ET DE LA LOCALISATION DU CUIVRE

THÈSE POUR LE DIPLOME SUPÉRIEUR DE PHARMACIEN

présentée et soutenue publiquement le samedi 6 mars 1937

PAR

Ernest-Francis COUSIN

Pharmacien-Commandant des Troupes coloniales,
Ancien assistant à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux,
Lauréat de la Faculté,
Prix des Travaux pratiques

Né à BREST (Finistère), le 13 juillet 1901

Examinateurs de la Thèse :

MM. GOLSE, professeur ..... *Président.*
DUPOUY, professeur ..... *Juges.*
LABAT, professeur ..... *Juges.*
VITTE, agrégé ..... *Juges.*

BORDEAUX
IMPRIMERIE-LIBRAIRIE DELMAS
6, place Saint-Christoly

1937

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1936-1937. — N° 1

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ÉLIMINATION ET DE LA LOCALISATION DU CUIVRE

THÈSE POUR LE DIPLOME SUPÉRIEUR DE PHARMACIEN

présentée et soutenue publiquement le samedi 6 mars 1937

PAR

Ernest-Francis COUSIN

Pharmacien-Commandant des Troupes coloniales,
Ancien assistant à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux,
Lauréat de la Faculté,
Prix des Travaux pratiques

Né à BREST (Finistère), le 13 juillet 1901

Examinateurs de la Thèse

MM. GOLSE, professeur ..... *Président.*
DUPOUY, professeur ..... *Juges.*
LABAT, professeur ..... *Juges.*
VITTE, agrégé ..... *Juges.*

BORDEAUX
IMPRIMERIE-LIBRAIRIE DELMAS
6, place Saint-Christoly

1937

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYEN : M. MAURIAC.

ASSESSEUR : M. LABAT.

DOYEN HONORAIRE : M. C. SIGALAS.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. POUSSON, MOURE, RIVIÈRE, BARTHE, DENIGÈS, BEILLE, CASSAËT, CHAVANNAZ, PACHON.

PROFESSEURS :

	MM.		MM.
Clinique médicale	MAURIAC.	Zoologie et parasitologie	MANDOUL.
id.	DUPÉRIÉ.	Médecine expérimentale	AUBERTIN.
Clinique chirurgicale	BÉGOUIN.	Clinique ophtalmologique	TEULIÈRES.
Clinique chirurgicale et gynécologique	GUYOT.	Clinique chirurg. infantile et orthopédie	ROCHER.
Pathologie et thérapeutique générales	CARLES.	Clinique méd. des maladies des enfants	CRUCHET.
Clinique d'accouchements	ANDÉRODIAS.	Chimie biologique et médicale	DELAUNAY
Anatomie pathol. et microscopie clinique	SABRAZÈS.	Physique médicale et pharmaceutique	C. SIGALAS.
Anatomie	VILLEMIN.	Médec. coloniale et clin. des mal. exotiques	BONNIN.
Anatomie générale et histologie	G. DUBREUIL.	Clinique des malad. cutanées et syphilitiques	PETGES.
Hygiène	LEURET.	Clinique des maladies des voies urinaires	DUVERGEY
Médecine légale et déontologie	LANDE.	Clinique des malad. nerveuses et mentales	ABADIE.
Electroradiologie et clin. d'électricité médic.	RÉCHOU.	Clinique d'oto-rhino-laryngologie	PORTMANN.
Chimie	CHELLE.	Toxicologie et hygiène appliquée	LABAT.
Botanique et matière médicale	GOLSE.	Hydrologie thérapeutique et climatologie	CREYX.
Pharmacie	DUPOUY.	Clinique odonto-stomatolo ique	DUBECQ.

MM. LACOSTE (Histologie). PERY (Obstétrique). PERRENS (Maladies mentales). PAPIN (Chirurgie générale). R. SIGALAS (Parasitologie et sciences naturelles). JEANNENEY (Chirurgie générale).

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.		MM.
Anatomie	N.	Chirurgie générale	MASSÉ.
id.	DUFOUR.	id.	DARGET.
Physiologie	FABRE.	Obstétrique	RIVIÈRE.
Médecine générale	PIÉCHAUD.	Ophtalmologie	BEAUVIEUX.
id.	DELMAS-MARSALET.	Oto-rhino-laryngologie	DESPONS.
id.	DE GRAILLY.	Dermatologie et syphiligraphie	JOULIA.
id.	FONTAN.	Physique médicale	WANGERMEZ.
id.	BROUSTET.	Chimie générale pharmaceut. et toxicologie	VITTE.
id.	DERVILLÉE.		

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.		MM.
Physiologie	FABRE.	Physique médicale et pharmaceutique	WANGERMEZ
Médecine opératoire	PAPIN.	Médecine légale	DERVILLÉE.
Accouchements	RIVIÈRE.	Urologie	DARGET.
Pathologie médicale	DELMAS-MARSALET.	Botanique	GIRARD.
Puériculture	FAUGÈRE.	Bactériologie	MOUREAU.
Pharmacie chimique	VITTE.	Législation pharmaceutique	POPLAWSKI.
Zoologie et parasitologie	R. SIGALAS.		

Ophtalmologie ..... MM. CABANNES (en congé).

Orthopédie chez l'adulte, pour les accidentés du travail, les mutilés de guerre et les infirmes. N.

Le Secrétaire de la Faculté : ROUGERIE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A MON PERE — A MA MERE

En témoignage de filiale gratitude.
Votre vie a été un exemple constant de dévouement.

A LA MEMOIRE DE MON FRERE

A MON FRERE

A MES SŒURS

AUX MIENS

A LA MEMOIRE

DU PHARMACIEN-COLONEL CHEYSSIAL

Professeur à l'Ecole d'application du Service de Santé des Troupes coloniales.

A MES CHEFS ET A MES CAMARADES

DU CORPS DE SANTE COLONIAL

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ VITTE

Chargé du Cours complémentaire de démonstration et préparations pharmaceutiques,
Pharmacien des Hôpitaux,
Officier d'Académie.

Respectueux hommage.

A Monsieur le Professeur CHELLE

Professeur de Chimie
à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux,
Membre correspondant de l'Académie de Médecine,
Chevalier de la Légion d'honneur,
Officier de l'Instruction publique.

Veuillez trouver ici le témoignage de ma gratitude pour la formation scientifique que vous m'avez imprimée et la bienveillance que vous m'avez toujours montrée.

A Monsieur le Professeur A. LABAT

Professeur de Toxicologie et d'Hygiène appliquée
à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux,
Pharmacien en Chef des Hôpitaux,
Chevalier de la Légion d'honneur,
Officier de l'Instruction publique.

Vous n'avez jamais cessé, au cours de mes années d'études et depuis ma sortie de la Faculté, de m'aider de vos conseils et des ressources de vos vastes connaissances. Je tiens à vous exprimer ici toute ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur DUPOUY

Professeur de Pharmacie
à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux,
Chevalier de la Légion d'honneur,
Officier de l'Instruction publique.

Vous avez été le guide éclairé de mes premiers pas dans la carrière pharmaceutique et le maître incomparable dont les principes et les leçons n'ont jamais été oubliés. Permettez-moi de vous dire ici toute ma reconnaissance pour la formation que vous m'avez donnée et la bienveillance que vous m'avez toujours témoignée, jointe à l'assurance de mon profond respect.

A MON PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur GOLSE

Professeur de Matière médicale et de Botanique
à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux,
Docteur ès Sciences physiques,
Pharmacien des Hôpitaux,
Officier de l'Instruction publique.

Vous avez bien voulu m'accueillir et faire bénéficier ce travail de vos précieux conseils. Veuillez recevoir ici l'expression de ma reconnaissance infinie avec l'assurance de mon respectueux attachement.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

DE

L'ÉLIMINATION ET DE LA LOCALISATION DU CUIVRE

I

INTRODUCTION

L'idée de la présente étude nous a été suggérée par M. le Professeur Golse, qui, au cours de travaux antérieurs, avait étudié et mis au point différentes méthodes de dosage microchimique du cuivre.

Sur ses conseils, nous nous sommes proposé, dans la première partie de notre travail, d'étudier l'élimination du cuivre absorbé quotidiennement dans l'alimentation, en précisant les facteurs qui la conditionnent.

Nous avons suivi également l'élimination de ce métal employé dans un but thérapeutique, en particulier dans les cas de staphylococcie.

Dans une deuxième partie, nous avons déterminé la localisation du cuivre chez le chien normal et intoxiqué par

différentes voies, stomacale ou parentérale, au moyen de sulfate de cuivre pur.

Nous tenons à remercier MM. les Médecins Colonels Sicé et Mercier, le Médecin Lieutenant-Colonel Roussy, les Médecins Commandants Assali et Bordes, les Médecins Capitaines Soulage et Jospin, pour le concours qu'ils nous ont si aimablement donné.

II

LES MICRO-REACTIONS DU CUIVRE

La *mise en évidence* de petites quantités de cuivre est basée, soit sur la constatation de certaines propriétés d'ordre physique présentées par cet élément, soit sur la faculté que possède ce métal d'entrer en réaction avec des corps appartenant à la chimie minérale ou aux fonctions les plus diverses de la chimie organique.

Au cours de cet exposé, nous noterons celles de ces réactions qu'on a utilisées dans un but quantitatif. Elles se rapportent pour la plupart aux sels de cuivre-II, les sels de cuivre-I s'y ramenant par une simple diminution des valences. Le passage de l'une à l'autre de ces séries de sels est des plus faciles à réaliser sous l'influence d'agents oxydants ou réducteurs.

Nous nous rendrons compte de l'importance de plus en plus grande prise par les molécules organiques dans la détection de ce métal par formation de teintes vives ou de complexes généralement colorés, de masses moléculaires très élevées, sensibilisant par conséquent la réaction, très peu solubles dans l'eau.

Par contre, ces mêmes complexes jouissent le plus souvent de la propriété de se solubiliser dans les solvants organiques non miscibles à l'eau, ce qui permet leur extraction et leur comparaison colorimétrique ultérieure, en même temps que leur concentration sous un faible volume, circonstance particulièrement favorable à des applications microchimiques. Dans certains cas, ces complexes peuvent servir à l'isolement rapide et souvent quantitatif de traces de cuivre réparties dans une masse considérable de matériaux et permettent

parfois de faire la part entre le cuivre minéral et le cuivre organique.

Nous avons basé sur les distinctions précitées une classification un peu arbitraire, sans doute, car la formation d'un précipité amorphe ou cristallisé facile à identifier au microscope, ou celle d'une coloration, peuvent être le fait d'un seul et même réactif. L'aspect final dépend essentiellement de la concentration du milieu en l'élément caractéristique.

Nous rechercherons donc les petites quantités de cuivre :

1. Par des méthodes physiques;
2. Par des méthodes physico-chimiques;
3. Par des réactifs minéraux, donnant :
   a) des colorations;
   b) des précipités amorphes ou cristallisés;
4. Par des réactifs organiques, donnant :
   a) des colorations;
   b) des précipités amorphes ou cristallisés.

Notons au passage que les auteurs ne sont pas d'accord sur les limites de sensibilité données par les différentes réactions, et qu'on trouve dans la littérature chimique des divergences très notables. De plus, leur spécificité n'étant pas absolue, la séparation préalable du métal s'impose le plus généralement.

1. — *Détection par les méthodes physiques.*

La spectrographie, la polarographie, la polarisation rotatoire magnétique, les rayons X, les phénomènes capillaires, l'électrolyse dans des milieux de différentes réactions, ont permis la caractérisation de petites quantités de cuivre dans des milieux très complexes. En principe, lorsqu'il s'agit d'un milieu organique, l'examen par les différentes méthodes physiques sera toujours précédé d'une minéralisation appropriée (destruction par voie sèche, destruction par voie humide, destruction par voie mixte) pour amener le cuivre à l'état

d'ions. C'est ainsi que, dans les tissus normaux et pathologiques, végétaux ou animaux [6, 245, 366, 367, 416, 470, 360, 339, 97, 417, 401, 49, 32, 185, 186, 418, 182, 187, 90, 419], les excrétions et les sécrétions [170, 554, 420, 373], divers auteurs, pour la plupart étrangers, ont décelé des traces infimes de ce métal par spectrographie. En se plaçant dans des conditions expérimentales bien déterminées au moyen d'appareils préalablement étalonnés, le dosage, au moins approximatif, peut être obtenu par simple consultation d'une courbe. Dans les milieux purement minéraux, l'examen se fera directement ou après concentration, comme dans le cas des eaux [1, 371, 56, 183, 306, 175, 397].

Bayle et Amy [6] observeraient ainsi les raies ultimes de de Grammont pour 1×10^{-7} g. de cuivre.

La polarographie donne aussi d'excellents résultats. Elle a permis l'identification de différents métaux, en particulier du cuivre, dans les milieux de toute nature [484, 20, 285, 25, 248, 21].

A. H. Turner, E. Sampé et Fr. Kbvetzer ont utilisé les rayons X [535, 284].

La polarisation rotatoire magnétique permet la détection et le dosage du cuivre par examen d'un simple graphique [43].

Il n'est pas jusqu'au gonflement de la cellulose qui n'ait été mis à profit [53], ainsi d'ailleurs que la séparation capillaire. Dans ce but, Feigl et H.-J. Kapulitzas utilisent le composé [152] :

$$HN = C - SH$$

$$HN = C - SH$$

indiqué par P. Ray [425], donnant avec le cuivre-II en solution ammoniacale un précipité amorphe de formule :

$$\begin{array}{l} HN = C \quad S \\ \qquad\quad | \qquad\quad \diagdown \\ \qquad\quad | \qquad\quad\quad Cu \\ HN = C - S \diagup \end{array}$$

Conjuguée avec l'observation microscopique, la séparation capillaire permet de retrouver des traces de cuivre en présence de nickel ou de cobalt. La limite de sensibilité est de 1×10^{-6} g.

Le dosage sans doute approché peut se faire par comparaison avec des planches colorées.

L'électrolyse n'est pas, à proprement parler, un moyen de détection mais bien plutôt de séparation. Dans certains cas, l'examen des électrodes peut donner des renseignements précieux [50], mais, le plus généralement, le dépôt invisible à l'œil nu est redissous et mis en évidence par des réactifs spécifiques de seconde main.

Cependant, les variations dans les valeurs de potentiels de décomposition avaient déjà permis à P. Dutoit et Von Weisse de caractériser et de doser des traces de cuivre avec une précision de 1,3 % pour 0,68 mg. [137]. Zbinden [556], étudiant la marche du phénomène, s'est rendu compte que les courbes de variation des forces électro-motrices pendant les dépôts du métal ne sont pas régulières et ne permettent pas un dosage précis. Aussi a-t-il proposé de faire l'opération inverse, c'est-à-dire de suivre les variations d'intensité du courant pendant la dissolution du cuivre préalablement déposé à la cathode. L'opération est considérée comme achevée quand il y a une chute brusque de l'intensité du courant. Cette méthode, très sensible, présenterait, selon l'auteur, une erreur de 3,3 % pour les petites doses de cuivre [556].

Dans certains cas cependant, par l'usage des microbalances, il est possible de procéder à un dosage gravimétrique [208, 243, 26]. Le dépôt du métal, qui se fait le plus généralement en milieu sulfurique, peut aussi s'effectuer en milieu ammoniacal [382], selon la technique de A. Okac, très rapide, n'exigeant pas plus de 10 minutes.

2. — *Détection par les méthodes physico-chimiques.*

Par électrolyse et formation subséquente de protéinate de cuivre vert aux dépens d'une membrane de parchemin animal, Chanoz met en évidence, par un dispositif approprié, le métal dans une solution millionième normale de sulfate de cuivre-II [76, 77].

L'oxydation catalytique de la cystéine en cystine sous l'influence de traces de cuivre et la mesure manométrique de l'oxygène consommé se trouve à la base de la recherche et du dosage des traces de ce métal. Warburg l'a utilisé pour la détermination du cuivre minéral dans le sang [311, 312, 165, 7].

3. — *Détection au moyen des réactifs minéraux.*

a) Réactifs minéraux donnant des colorations.

Nous suivrons, pour l'exposition, l'ordre de complexité croissante des réactifs, en commençant par l'*ammoniaque*, qui donne une coloration bleu céleste, souvent utilisée pour le dosage des traces de cuivre [208], au moyen d'étalons titrés, ou du colorimètre, ou encore par détermination des valeurs d'absorption, de réduction de la lumière, avec consultation ultérieure d'une courbe [73, 270, 352, 288, 289]. Cette réaction élémentaire a été souvent utilisée pour le dosage de traces de cuivre. Sensibilité : 1×10^{-5} g.

E. Cresti [96] utilise l'action d'un mélange de vapeurs de brome et d'acide bromhydrique pour la mise en évidence du cuivre déposé sur lame de platine après électrolyse; le cuivre traduit sa présence par une coloration violette. Denigès, Sabatier, Denigès et Simonnot, en réglementant cette réaction, la sensibilisent au point de mettre en évidence 1×10^{-5} g. de cuivre [117, 118, 463].

L'iodure de potassium, par double décomposition avec les sels de cuivre-II, donne :

$$Cu'' + 2\,I' = Cu\,I + I.$$

L'iode libéré dans cette réaction permet le dosage de petites quantités de cuivre grâce à sa teinte jaune ou à la teinte bleue qu'il communique à l'empois d'amidon [289]. En outre, comme nous le verrons plus loin, l'iodure de potassium constitue un réactif de précipitation très sensible, qui semble avoir été trop systématiquement négligé. Lorsque la quantité d'iode libéré est suffisante, un dosage volumétrique par une solution de thiosulfate de sodium de concentration appropriée permet une appréciation dans d'excellentes conditions [351, 136, 105].

L'emploi du réactif molybdique-phosphorique repose sur l'action de l'oxyde de cuivre-I sur l'anhydride molybdique Mo^2O^3 (Folin et Wu), avec production d'une teinte bleue due à la formation de MoO^2, que l'on peut doser par le permanganate de potassium en solution étendue. De cette réaction découle là possibilité de doser les sucres réducteurs [169] et le cuivre, ainsi que l'ont fait Guillemet et ses collaborateurs [209 à 218, 220], Deborde [112], E. Philippi [392, 393] et F. Kerüler [286]. Un perfectionnement dans le dosage a été apporté en employant comme indicateur l'acétate de benzidine, préconisé par Guillemet et Thivolle [219].

Le sulfate de sesquioxyde de titane donne avec les sels de cuivre-II un reflet cuivré par réflexion et bleu par transmission, dû à une fine suspension de cuivre métallique sensible au 1×10^{-5} g. [290].

Par voie sèche, la perle au borate permet de retrouver 5×10^{-2} mg. de cuivre [22].

Denigès [121] a utilisé les propriétés catalytiques oxydantes des sels de cuivre-II vis-à-vis du manganèse en présence d'hypobromite de sodium, avec formation de permanganate coloré en rose, facilement transformable en manganate vert.

Haux [227] décèle et dose des traces de cuivre par mesure de leur action catalytique, en appréciant la vitesse de réaction entre le sulfocyanate de fer-III et le thiosulfate de sodium, jusqu'à décoloration de la liqueur. Cependant, cette vitesse, très contingente des différents éléments présents

dans le milieu réactionnel, subit des variations telles qu'il est assez difficile d'attribuer une trop grande valeur aux chiffres fournis.

b) Réactifs minéraux donnant des précipités.

En solution acide, l'acide sulfhydrique donne avec les sels de cuivre-II un sulfure noir de cuivre-II (SCu) qui précipite immédiatement en solution concentrée, mais reste à l'état colloïdal en solution diluée et floculе au bout d'un certain temps. Les agents sulfurants et réducteurs, tels que le thiosulfate de sodium, donnent du sulfure de cuivre-I (SCu^2), beaucoup moins oxydable. Avec l'acide sulfhydrique et les sulfures alcalins, la sensibilité est de 1×10^{-5} g. Cette précipitation n'est pas, à vrai dire, très caractéristique, et constitue plutôt un moyen commode de séparation, mis à profit par la plupart des chercheurs. Cependant, en particulier dans les eaux, elle a permis le dosage diaphanométrique, voire même colorimétrique, du cuivre [476, 369, 548, 282].

Le ferrocyanure de potassium, en solution acide ou neutre, donne, selon les concentrations, un précipité rouge brun ou une coloration marron de ferrocyanure de cuivre-II, sensible à 2×10^{-2} mg., utilisée par de nombreux auteurs pour le dosage du cuivre dans les milieux les plus variés [333, 523, 184, 232, 349, 19, 442, 364, 518].

Modifiée par Frémy, sa limite de sensibilité descend à 1×10^{-4} mg. Maquenne et Demoussy, par leur technique, mettent en évidence $2{,}5 \times 10^{-3}$ mg. de cuivre en opérant en présence de sels de zinc. Récemment, cette réaction a été utilisée par H. H. Lampitt, E. B. Hughes, P. Bilham et C. H. F. Fuller [171, 116, 448, 319].

Pozzi-Escot [146], additionnant un sel de cuivre-II d'ammoniaque en léger excès, d'iodure, a obtenu des cristaux microscopiques nets permettant la recherche de petites quantités de cuivre.

L'arsénite de sodium, préconisé par Currie [102], permet

de retrouver une partie de sulfate de cuivre-II dans 133.000 parties d'eau. Réglementée, cette réaction peut se prêter à une comparaison colorimétrique.

L'acétate de plomb (Frémy et Schoorl [172]), évaporé en présence d'une solution d'un sel de cuivre-II additionnée d'une solution acétique d'acétate d'ammonium et de nitrite de potassium, permet d'obtenir des cristaux de nitrite triple de cuivre, plomb, potassium, de teinte très foncée.

J. Roldan a montré que toutes les fois que le cuivre est en présence de l'anion $[Fe\ (CN)^6]_{IV}$ et de l'hydroxylamine, on observe un précipité blanc colloïdal, se déposant lentement, laissant surnager un liquide fortement coloré en orangé et possédant de plus une fluorescence marquée [449].

Montequi, Golse [358, 359, 199], ont étudié la formation du complexe de sulfocyanate de cuivre-II avec le mercure et le zinc, de coloration violette. Réglementée par Golse, cette réaction permet le dosage de petites quantités de cuivre. Cette précipitation avait été précédemment étudiée par Clève, Rosenheim et Cohen, Behrens et Bourgeois [88, 89, 27, 153].

L'iodomercurate de potassium précipite quantitativement le cuivre, ainsi d'ailleurs que le cadmium et le nickel [524].

Le sel de Reinecke insolubilise les sels de cuivre-I sous forme facile à filtrer, difficilement soluble dans les acides forts [337].

Les sels de cuivre-II peuvent contracter avec le nitrate de plomb et de potassium des combinaisons triples cristallisées faciles à caractériser par examen microscopique [472].

L'iodure de potassium est un réactif extrêmement sensible des sels de cuivre; il permet de déceler 0,25 microgramme de cuivre [221].

4. — *Détection avec des réactifs organiques.*

a) Réactifs organiques donnant des colorations.

Les sels de cuivre-II donnent, avec :

1° L'acide diamino-1-2-anthraquinone sulfonique 3, en solution alcaline, une coloration bleue [537, 20].

2° L'hématoxyline, une coloration bleue intense, même aux dilutions où l'ammoniaque ne donne plus de coloration, se résolvant par le repos prolongé sous forme de laque bleue [31, 446].

3° Le résorcinol, en solution ammoniacale, une coloration bleue [326, 41].

4° L'hydroquinol et le naphtol-α, en milieu légèrement chlorhydrique et au bain-marie bouillant, une coloration bleue augmentant rapidement d'intensité en ce qui concerne l'hydroquinol et une coloration violette en ce qui concerne le naphtol-α. Sensibilité : 1×10^{-4} mg. [5].

5° L'urobiline, une coloration rouge en présence d'ammoniaque. Sensibilité : 1×10^{-5} mg. [143, 424].

6° L'α-dipyridine et l'o-phénanthroline, des complexes dont les colorations ne présentent rien de spécifique. Mais si l'on fait agir sur ces complexes un agent réducteur, tel que le sulfite acide de sodium, l'hydroxylamine, l'hydrazine, on obtient des colorations intenses, qui varient du rouge orange au violet, selon le composé. La réaction se fait très facilement en réduisant les sels de cuivre-II en solution ammoniacale, puis ajoutant la base à la solution incolore. Sensibilité : 3×10^{-2} mg. [522].

7° Le vert direct B, chauffé vers 90°, une coloration allant du vert bleu au rose violacé. Le pH optimum doit être compris entre 6 et 9, et le rapport $\frac{\text{colorant}}{\text{cuivre}}$ doit être égal à 10. Cette réaction permet d'apprécier approximati-

vement le cuivre. Elle serait sensible au milligramme de cuivre dissous dans un litre d'eau [107].

8° Le piperidyl-dithioformate de piperidinium, utilisé en solution alcoolique, une coloration jaune brun [233].

9° La dimethylglyoxine, associée à la pyridine, le persulfate d'ammonium et le nitrate d'argent [87], ou bien le periodate remplaçant les deux oxydants précédents [294], donnent une coloration violet rouge. Sensibilité : 1×10^{-4} g. par litre [264].

10° La cryogénine, une coloration rouge proportionnelle à la dose de cuivre présente dans le milieu [374].

11° L'alizarine sulfonate de sodium, une coloration bleu violet [191].

12° L'acide rubéanique, une coloration noire [426].

13° L'hydroxyhydroquinol, une coloration bleue [338].

14° La p-diméthylaminobenzylidène-rhodamine, une teinte rouge orangé avec les sels de cuivre-II et une réaction plus intense avec les sels de cuivre-I [154-178]. Au moyen de ce réactif. Kolthoff [293] décèle jusqu'à 1×10^{-4} mg. de cuivre par litre d'eau distillée selon un mode opératoire particulier.

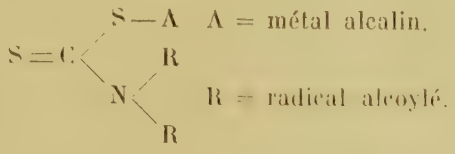
15° La diphénylcarbazide en solution alcoolique récente donne une coloration violette intense. La réaction marche en solution neutre virant au jaune par solubilisation dans le chloroforme ou le benzène [151, 74]. Sensibilité : 1×10^{-5} g.

16° La formaldoxine de Bach [17], ou plus exactement le chlorhydrate de trioxymidométhylène de formule $[CH^2(NOH)HCl]^3$, donne, avec les sels de cuivre-II, en solution légèrement potassique, une coloration violette sensible au 1×10^{-6} g. Cette réaction a été particulièrement étudiée par Mlle Calassou [63] et M. Denigès [119, 120].

17° Le naphtol-β, une coloration jaune vert. Sensibilité : 3×10^{-6} g. [177].

18° Les alcoylthiosulfocarbamates, des réactions très intéressantes. Delépine a montré qu'en faisant agir le sulfure de

carbone sur les amines grasses et un alcali, on obtenait des composés de formule :



qui donnent, avec les métaux Cu, Fe, Ni, des colorations très vives [114, 115]. Avec une solution contenant 1×10^{-6} g. de cuivre-II, on obtient une coloration jaune très vive disparaissant par addition de cyanure de sodium, à l'inverse des colorations données par les autres métaux. De plus, le produit coloré peut se rassembler dans un petit volume de solvants organiques, permettant de retrouver 1×10^{-6} g., et même 1×10^{-8} g. Ce réactif très intéressant permet d'isoler dans un milieu complexe le cuivre présent, même à l'état de traces excessivement faibles. En minéralisant le résidu laissé par évaporation du solvant organique, on peut alors procéder à une séparation des métaux entraînés simultanément, et mettre en évidence le cuivre par une réaction plus spécifique. Callan et Henderson [64] ont réglementé l'emploi de ce réactif. Mc Farlane [149] l'a appliqué au dosage du cuivre dans les matières organiques. Depuis, d'innombrables auteurs l'ont utilisé, et, pour ne citer que les plus récents, Cheftel et Blass, dans une note inédite, l'ont employé pour le dosage du cuivre dans les liquides contenant de la chlorophylle et des protéines après élimination de ces corps par l'acide tungstique (tout comme Thompsett [530] le faisait dans le sang après défécation trichloracétique), Lasausse et Frocrain [174] pour le dosage de faibles quantités de cuivre dans les milieux biologiques, Lesne, Zizine et Briskas [52].

La réaction devant se passer en milieu alcalin, la précipitation du phosphate de calcium sera empêchée par addition de citrate de sodium [530], ainsi que celle du fer [148].

Parallèlement, le pyrophosphate de sodium s'opposera à l'insolubilisation simultanée du fer et du manganèse [530].

19° L'oxyquinoléate de cuivre-II traité par du cyanure de potassium forme une coloration rouge, qui ne semble pas liée à l'ion Cu_{II}, mais résulte plutôt de la réaction de l'oxyquinoléine avec le cyanogène formé à la suite d'une réaction entre l'ion Cu_{II} et le cyanure de potassium. Sensibilité : 1×10^{-5} g. [294, 295].

20° Les solutions de sels de cuivre-II additionnées d'un cyanure alcalin et de réactif sulfo-azoto-molybdique développent une coloration bleue se dégradant assez rapidement, mais permettant toutefois la réalisation d'un dosage [202]. La sensibilité atteint les plus hautes limites, puisque cette réaction permet de déceler 1×10^{-3} mg.

21° L'éthylxanthate de sodium donne une coloration jaune qui peut servir à un dosage [10, 66, 521, 147, 408].

22° Les propriétés catalytiques du cuivre ont été observées en 1908 par le Professeur Labat [317], qui a montré la recoloration du réactif de Kastle-Meyer en présence de glycérine pure et de sels de cuivre. Thomas et Carpentier [69-70] décèlent 1×10^{-8} g. de cuivre au moyen de cette réaction, qui, d'après Mlle Lambert et Balthazar [318], serait positive avec d'autres métaux, sans addition d'eau oxygénée, ce qui les différencierait du sang [18].

23° Imbert et Pilgrain [267, 395, 396], inversant la réaction de Schoenbein, retrouvent 2×10^{-5} g. de cuivre. Reprise par Poirot [399], la nouvelle technique de cet auteur permettrait d'arriver à déceler 1×10^{-7} g. Ces réactions d'oxydation, d'ordre catalytique, ne le cèdent donc en rien aux autres réactions précédemment décrites, tout au moins au point de vue de la sensibilité.

24° L'action catalytique du cuivre sur les phénols, utilisée déjà par Denigès pour le diagnostic de la morphine, a inversement servi à Fulton [177] pour la caractérisation du cuivre aux dépens de cet alcaloïde, de phénols variés, tels que thymol, résorcinol, 4-hydroxy-1-2-diméthylbenzène, par formation de colorations variées.

b) Réactifs organiques donnant des précipités.

L'acide amino-caproïque précipite en gris bleu jusqu'à 4×10^{-3} mg. de cuivre-II en liqueur neutre ou acétique [222].

Selon Baudisch [23], le cupferron donne un précipité verdâtre de formule $Cu\ (C^6H^5N^2O^2)^2$, en solution d'acidité organique, qui peut cristalliser dans certaines conditions [342, 343]. Ce réactif a été particulièrement utilisé par Pinkus et Martin, et Martini.

Le cupron, ou benzoïne-oxime, préconisé par Feigl [155] en solution alcoolique ou ammoniacale, permet la formation d'un précipité vert insoluble dans l'eau et l'alcool, insoluble dans l'ammoniaque diluée, l'acide acétique, un peu soluble dans l'ammoniaque concentrée et très soluble dans les acides minéraux. La sensibilité serait de : $3{,}3 \times 10^{-4}$ g. Mme Gruzewska et G. Roussel [207], utilisant la solubilité du complexe dans le chloroforme, rendent la réaction dix fois plus sensible, sans parvenir cependant à la rendre quantitative.

L'α-nitroso-β-naphtol, découvert par Fuchs en 1875, proposé la même année par Inguski et Kuorth pour la séparation du fer et du cuivre, a permis à Mme Gruzewska et G. Roussel [207, 134] le dosage du cuivre embryonnaire chez le veau.

L'acide anthranilique [126, 269] précipite en vert les solutions de cuivre-II, neutres, ou très faiblement acides et très diluées. Les cristaux possèdent la formule $(C^7H^6O^2N)^2\ Cu$. Sensibilité : 1×10^{-6} g.

Berg [37] obtient, à partir de l'ortho-oxyquinoléine et du cuivre, un précipité vert cristallin, qu'il pèse après dessiccation ou qu'il estime par iodométrie, selon la méthode de Bruhns [54]. La réaction est très sensible; elle donne encore un précipité avec 3 cm^3 d'une solution acéto-acétique contenant 8×10^{-3} mg. de cuivre, ou avec 5 cm^3 d'une solution tartro-alcaline contenant $1{,}8 \times 10^{-2}$ mg. de cuivre.

Cet ortho-oxyquinoléate de cuivre se redissout dans une solution de cyanure de potassium en donnant une coloration framboise très intense [294].

Hahn et Hartleb dosent volumétriquement le cuivre au moyen de ce réactif [228].

Un dérivé simple de cette base, le sulfate appelé *quinosol*, est un réactif précieux pour la détection et le dosage gravimétrique du métal [319].

La 5-7-bromo-o-oxyquinoléine [224, 225, 38, 85] est utilisée dans le même but.

G. Gutzeit et R. Monnier ont proposé l'emploi des bases complexes, telles que la 5-(4-sulfo-1-1-naphtylazo-8-hydroxyquinoléine) et la 5-(p-Sulphenylazo-8-hydroxyquinoléine), qui se colorent en rouge par les sels de cuivre-I [223].

Korenmann [305] a repris la méthode de Renz [438] basée sur la propriété de la quinoléine de donner avec les chlorures métalliques des précipités cristallins caractéristiques, tandis que, dans les mêmes conditions, les autres sels ne donnent rien. Avec le cuivre-II, en présence d'iodure de potassium et d'acide chlorhydrique, il obtient des aiguilles parallélipipédiques, des rhomboèdres aplatis verdâtres, d'aspect octogonal, tandis qu'avec le sulfocyanate d'ammonium, il se forme un mélange d'aiguilles, de tables carrées ou parallélépipédiques de coloration verte.

F. Aphraim [13, 14] forme aux dépens de la salicylaldoxime un sel de formule $(C^7H^6O^2N)^2$ Cu de coloration vert jaune, dont la précipitation n'est complète qu'en milieu faiblement acétique. Avec une partie de cuivre dans 100 litres d'eau, on obtient un précipité; la même dose dans 500 litres donne un trouble net, qui se résout après plusieurs jours de repos en une masse floconneuse; pour une dilution double de la précédente, l'opalescence est encore visible. La formation de ce complexe [431, 432, 443, 444] a été mise à profit dans un but quantitatif par Reif, Astin et Riley, et Riley.

Un corps voisin, l'aldoxime-p-homo-salicylique, a été utilisé comme réactif pour le cuivre par C. H. Kao et K. H. Chen [80].

Une autre réaction peu connue, d'ailleurs à juste titre, a été proposée par W. Hieber [251]. Elle consiste à combiner le cuivre-II sous forme d'acétate avec la forme énolique de

l'acétylacétate d'éthyle. Le précipité obtenu est insoluble dans l'eau, mais soluble dans les solvants organiques, en particulier dans le chloroforme. Il peut être pesé ou dosé par iodométrie.

Le dinitro-résorcinol précipite le cuivre en brun foncé [93].

La dicyandiamidine $(NH^2 - C(=NH) - NH - CO - NH)^2$ forme un composé qu'on a songé à utiliser en vue d'un dosage gravimétrique [7].

R. J. Mc. Ilroy [266], additionnant une solution d'un sel de cuivre-II de sulfocyanate de potassium, de deux à trois gouttes d'une solution aqueuse de paraphénylène-diamine, obtient un précipité noir de sulfocyanate de cuivre-II et de paraphénylène-diamine. Ce précipité ne se forme que dans les solutions neutres ou ammoniacales, car il est soluble dans les acides en donnant une solution noire.

L'acide quinaldique [46, 101] se montre un réactif précieux, aussi bien pour la détection que pour le dosage et la séparation du cuivre d'avec les autres métaux.

La dithizone, ou diphényl-thiocarbazone de H. Fischer [162, 163, 164, 136, 276], avec certains métaux lourds mono ou divalents (cuivre, plomb, argent, zinc, cadmium, Co), forme des complexes insolubles dans l'eau, mais solubles dans certains solvants organiques : tétrachlorure, sulfure de carbone. Ces complexes ont des colorations caractéristiques différentes d'un métal à l'autre. La dithizone permet aussi l'isolement du cuivre des milieux complexes, et, après calcination, son dosage iodométrique.

Spacu et Kuras [315] insolubilisent le cuivre-II dans ses solutions aqueuses neutres, faiblement acétiques ou ammoniacales, par la solution alcoolique de mercaptobenzothiazol. Le précipité floconneux jaune orangé a pour formule :

Ce réactif a été aussi utilisé par J. V. Dubsky et J. Ertilek [133]

G. Spacu et C. G. Macarovici [338], utilisant concurremment la benzidine ou la toluidine avec le sulfocyanate de potassium, obtiennent des complexes de formule : [Cu $(SCN)^2$, *base organique*].

Korenmann, dans une série de publications [298 à 302], a montré que les sels de cuivre, en présence de bases organiques, de sels halogénés ou d'acides picrique et sulfocyanique, formaient des combinaisons nettement cristallisées, qu'un examen microscopique suffit à identifier. C'est ainsi [300] qu'au moyen d'une solution de picrate d'ammonium les sels de cuivre-II donnent un précipité de formule :

$$[C^6H^2 (NO^2)^3 O]^2 \quad [Cu (NH^3)^4 H^2O],$$

se présentant en gros cristaux hexagonaux de couleur vert jaunâtre. Sensibilité : 0,05 microgramme.

Avec la cinchonine, l'aniline, le sulfocyanate, il y a insolubilisation amorphe avec la première base, cristallisée avec la seconde, présentant une sensibilité de 5×10^{-8} g. de cuivre.

Plus récemment, se basant sur les données de N. Parravano et A. Pasta [388] et de S. H. C. Briggs [51], le même auteur a obtenu, à partir de la pyridine, d'un bichromate et des sels de cuivre-II, des cristaux caractéristiques. Sensibilité : 0,1 microgramme.

Avec la paradiméthyl-aniline, l'iodure de potassium, Korenmann décèle jusqu'à $0,5 \times 10^{-6}$ g. de cuivre par formation de précipité de coloration violette [303], tandis qu'avec le sulfocyanate de mercure et l'ammoniaque, il obtient un précipité vert [304].

Spacu [497], faisant réagir la benzidine en solution alcoolique à 1 % fraîchement préparée sur une solution diluée et neutre de sels de cuivre-II, préalablement additionnée d'iodure de potassium, observe un précipité bleu foncé de composition :

Cu (benzidine) I^2.

L'acide gallotannique [104] se montre lui aussi un précieux réactif pour la détection et la séparation du cuivre, qu'il permet de doser ensuite par une méthode spécifique.

D'autre part, l'addition d'iodomercurate de potassium en excès à une solution neutre ou faiblement acide d'un sel de cuivre-II contenant de l'éthylènediamine produit un précipité du complexe :

$$(HgI^4) . (Cu, NH^2CH^2CH^2NH^2).$$

Mais HgI^4K^2 donnant simultanément avec l'éthylènediamine un précipité blanc, on maintient ce dernier en dissolution par addition de quelques gouttes d'une solution de sulfocyanate d'ammonium à 1-2 %; ce précipité est d'ailleurs soluble dans l'alcool à 40°-96° [498].

L'acide nitroso-chromotropique a été utilisé par E. Cherbuliez et S. Ansbacher [9].

La 2-3 diaminophénazine constitue un réactif sensible. Il donne avec le cuivre-II un précipité rouge [390].

Charrier et Beretta forment des complexes caractéristiques au moyen de composés aminés et hydrooxyazoïques [36].

Le sulfate d'urotropine et le sulfocyanate d'ammonium combinés au chlorure de cuivre-II donnent des tables triclinniques légèrement jaunâtres [344].

L'antipyrine donne facilement des complexes de nature cristalline facilement observables au microscope [144]. Il en est de même des composés acridiniques avec le sulfocyanate; la formule du complexe formé serait :

$$(C_{13}H_9 N, HCNS)_2 Cu (CNS)_2.$$

La pyrocatéchinol-aniline [138] est un réactif fidèle, ainsi d'ailleurs que le 2-7-diaminofluorène [65].

L'aminopyridine avec le sulfocyanate fournit des cristaux caractéristiques [4], alors que le chlorhydrate de p-aminophénol donne un précipité bleu violet, avec 0,2 microgramme de cuivre [540].

A. J. Folcini utilise concurremment la bianisidine et le diaminofluorène [167].

Entre les mains de A. A. Benedetti, Pichier et W. F. S. Spikes [505], le mercurisélénocyanate de potassium donne un précipité jaune [30], tandis que Martini [346] obtient avec la pyridine, la quinoléine et le sulfocyanate de potassium des cristaux verts monocliniques de formule :

$$3\,(C^5H^5N\,.\,HCNS)\,.\,Cu\,(NH^3)^4\,(CNS)^2$$

et

$$3\,(C^9H^6N\,.\,HCNS)\,.\,Cu\,(NH^3)^4\,(CN^5)^2.$$

Avec l'aniline, le composé serait $2\,(C^6H^5NH^2,\,SCNH)\,Cu\,(NH^3)^4\,(CNS)^2$ [346].

En 1922, Spacu [499] a montré que les sels de cuivre-II en présence de pyridine et de sulfocyanate [497] donnaient un précipité vert de sulfocyanate de cuivre-II-dipyridine $(SCN)^2\,Cu\,(C^5H^5N)^2$, qu'on peut peser directement [51] ou après incinération. La teinte verte qu'il communique au chloroforme permet une appréciation des petites quantités de cuivre par voie colorimétrique, jusqu'à 1×10^{-2} mg. Cette réaction a fait l'objet de nombreux travaux de la part de Spacu [503, 525] et de ses collaborateurs, ainsi que d'auteurs étrangers et français. Parmi ces derniers, citons Cuny [100], qui a tenté sans grand succès de la réglementer pour l'application à la détermination de petites doses de cuivre.

M. Golse a montré tout le profit que l'on peut tirer de cette réaction en titrant par oxydimétrie, au moyen de l'hypobromite de sodium, le sulfocyanate non entré en réaction. Ainsi réglementée, cette technique permet un dosage très satisfaisant, en même temps que très sensible, des petites doses de cuivre. Elle ne nécessite aucun appareillage spécial [202].

Les réactifs sont d'usage courant; il conviendra toutefois de les purifier pour éliminer les traces de cuivre qu'ils peuvent comporter. Cependant, à partir d'une certaine limite, la méthode volumétrique ne se trouve plus applicable, et l'on

doit recourir à l'extraction chloroformique du complexe suivie d'une estimation colorimétrique. De ce principe découlent diverses techniques, ne différant que par des détails d'importance secondaire.

La première en date est celle de Blazzo [42], modifiée par Elvehjem et Lindow [139] ; reprise par Schonheimer et Oshima [383], contrôlée par Derrien et Benoit [33], par Benoit [34]. Tous ces auteurs utilisent comme solvant le chloroforme, réactif courant, auquel Kleimann et Klinke préfèrent le bromobenzol, qui n'offre d'ailleurs aucun intérêt particulier. Les méthodes dont nous nous sommes servi, inspirées de ces principes, sont décrites d'une manière détaillée dans le chapitre suivant.

Nous avons pu constater qu'un homologue supérieur de la pyridine, l'α-méthylpyridine, ou α-picoline, contracte dans certaines conditions une combinaison avec les sels de cuivre-II en présence d'un sulfocyanate alcalin. Le complexe floconneux et amorphe présente une belle coloration verte; il est en partie soluble dans le $CHCl^3$, qu'il colore en vert brunâtre, facilement soluble dans les acides minéraux et l'ammoniaque officinale.

De l'étude à laquelle nous nous sommes livré, il résulte que la précipitation est irrégulière, et qu'il ne faut point compter l'utiliser dans un but quantitatif.

D'ailleurs la réaction originale de Spacu est d'une sensibilité nettement supérieure.

III

PURIFICATION DES REACTIFS

Les quantités de cuivre à doser étant en toutes circonstances très faibles, toutes précautions ayant été prises par ailleurs pour éviter leur déperdition, il convient de ne pas fausser les résultats en introduisant du cuivre apporté par des réactifs impurs. Pour cette raison, les différents réactifs utilisés dans la destruction, la précipitation et le dosage ont été soigneusement purifiés et ultérieurement éprouvés.

Passons en revue les réactifs en commençant par les produits solides :

a) Produits solides.

Le ***nitrate de magnésium,*** utilisé dans les destructions par voie sèche; le ***thiosulfate de sodium,*** le ***chlorure de mercure-II,*** utilisés dans les précipitations; le ***sulfocyanate de potassium,*** l'***acétate de sodium,*** ont été purifiés par cristallisations successives. Pour simplifier notre tâche et arriver à coup sûr à de bons résultats, nous sommes toujours parti de produits purs Rhône-Poulenc pour laboratoires. Les essais nous ont montré qu'une cristallisation dans de l'eau distillée exempte de cuivre suffisait dans la plupart des cas pour obtenir un produit donnant toute satisfaction.

b) Produits liquides.

Les produits liquides ont été purifiés par distillation dans un appareil entièrement en verre Pyrex construit sur les indications de M. le Professeur Golse.

C'est ainsi que l'***acide nitrique*** à 36-39° Baumé se laisse facilement purifier par redistillation sur du ***nitrate de sodium***

finement pulvérisé, en ne subissant au début de la chauffe qu'une très légère décomposition qui le colore légèrement en jaune.

L'*acide chlorhydrique* pur des laboratoires, vu sa constitution de mélange euzestique, a dû être additionné de son poids d'eau avant d'être distillé. Ainsi dilué et amené à la concentration de 20 % en poids en acide chlorhydrique, ce réactif subit facilement la purification. Cet acide chlorhydrique dilué est d'un usage constant comme réactif, et ce n'est que tout à fait exceptionnellement que nous avons préparé un acide concentré à partir de l'acide pur commercial, par déplacement du gaz chlorhydrique à l'aide d'acide sulfurique concentré; le gaz est alors condensé à saturation dans de l'eau distillée exempte de cuivre.

L'*acide sulfurique*, dont l'ébullition ne va pas sans quelques dangers, n'a pas été purifié; il a fait seulement l'objet d'essais qui ont toujours donné des résultats négatifs.

L'*acide perchlorique* est très aisément débarrassé des impuretés qu'il contient par redistillation. Cette opération peut se faire sans danger à la pression ordinaire, en utilisant l'appareil qui nous a servi pour la purification de nos réactifs liquides. Selon les conseils de Kahane, on peut utiliser simplement une cornue dont le col est engagé dans un ballon refroidi servant de condenseur. En raison de la lente décomposition spontanée que subit l'acide perchlorique vers 200°, le rendement est d'autant meilleur que la distillation est plus rapide; la seule précaution à prendre est d'écarter les objets qui pourraient prendre feu au contact de l'acide chaud en cas de rupture du ballon. Si l'on peut opérer sous pression réduite avec un appareil de verre entièrement rodé, la distillation est plus commode, plus rapide et aussi d'un meilleur rendement. Dans la pratique courante l'opération à la pression ordinaire suffit largement.

La préparation de l'*eau distillée*, d'un usage constant dans les analyses, a été l'objet de soins tout particuliers. Il ne pouvait être question un seul instant d'utiliser directement

une eau distillée préparée au moyen d'un alambic mural de cuivre, les doses de ce métal qui auraient pu être introduites dans les milieux en expérience risquant être supérieures à celles qui existaient initialement.

Nous nous sommes servi d'un appareil dont M. le Professeur Golse a donné le schéma. C'est un appareil distillatoire entièrement construit en Pyrex, comportant, entre le ballon et le réfrigérant, un tube déflegmateur qui empêche l'entraînement du liquide non distillé, et prolongé par un réfrigérant dont l'extrémité recourbée est surmontée d'une coupole de verre pour éviter la chute des poussières. L'alimentation continue en était assurée au moyen d'eau préalablement distillée.

L'***ammoniaque*** nécessaire aux neutralisations a été préparée en chauffant doucement le produit pur pour laboratoires dans le ballon en Pyrex déjà utilisé pour les acides et en recevant les vapeurs qui distillaient dans un récipient (ballon de Kjeldahl), contenant de l'eau distillée exempte de cuivre et soigneusement refroidie par un courant d'eau. Une solution très concentrée d'ammoniaque a été préparée dans le même récipient en chauffant au bain de chlorure de calcium un mélange de chlorure ou de sulfate d'ammonium pur avec de la chaux vive et en condensant les vapeurs comme précédemment.

La ***pyridine*** nécessaire à la formation du complexe a été, quoique incolore, soumise à une distillation, ainsi d'ailleurs que le chloroforme nécessaire aux extractions. Les deux réactifs ont été vérifiés après distillation quant à leur point d'ébullition. Ils se trouvaient conformes aux constantes admises.

Malgré ces purifications, nous avons estimé qu'une série de vérifications s'imposait.

Reprenant un à un les réactifs purifiés, nous leur avons fait subir la recherche des plus minimes traces de cuivre par la méthode colorimétrique dont le principe a été exposé plus haut, à savoir la formation d'une teinte bleue sous

l'action conjuguée de l'acide cyanhydrique et du réactif sulfo-azoto-molybdique.

Nous avons distillé avec toutes les précautions d'usage 500 cm³ d'acide nitrique, d'acide chlorhydrique à 20 %, d'ammoniaque, de pyridine, de chloroforme et 5 litres d'eau bidistillée.

Les résidus, transvasés dans des capsules de porcelaine, ont été évaporés au bain-marie, repris à trois ou quatre reprises différentes par l'eau bidistillée pour chasser toute trace du liquide originel. Au résidu sec obtenu, on ajoute 5 cm³ d'eau bidistillée, 2 cm³ de solution d'acide cyanhydrique, 2 cm³ de réactif sulfo-azoto-molybdique. Aucune teinte bleue ne s'est développée. Nos réactifs sont donc purs.

En ce qui concerne les *sels* utilisés, nous avons fait nos recherches sur :

5 cm³ de solution de nitrate de magnésium à 20 %;
20 cm³ de solution de chlorure de mercure-II à 5 %;
20 cm³ de solution de sulfocyanate de potassium à 10 %;
20 cm³ de solution de thiosulfate de sodium à 10 %;
20 cm³ de solution d'acétate de sodium à 10 %.

L'essai de la solution de nitrate de magnésium peut être opéré directement sans inconvénient par la technique précédente.

En ce qui concerne les autres sels, la solution introduite dans une capsule de porcelaine a été traitée par 15 cm³ d'acide nitrique pur employé en trois fois, l'addition d'acide ne se faisant qu'après obtention d'un résidu sec. La fin de l'opération était conduite comme précédemment. Toutefois la capsule contenant le résidu mercuriel a été légèrement calcinée avant l'essai.

Notons au passage que l'oxydation nitrique est indispensable pour le thiosulfate, qui, jouissant de propriétés réductrices, colore d'emblée le réactif sulfo-azoto-molybdique.

Après l'essai individuel des réactifs, nous nous sommes mis exactement dans les conditions de la pratique.

A 200 cm³ d'eau bidistillée additionnée de 5 cm³ d'acide chlorhydrique à 20 %, nous avons ajouté 5 cm³ de la solution de chlorure de mercure-II. Le mélange porté à ébullition a été additionné de 5 cm³ d'une solution de thiosulfate de sodium au 1/10. L'essai a été poursuivi exactement comme s'il s'agissait du dosage volumétrique qui sera exposé plus loin (méthodes de dosage), c'est-à-dire que le résidu de chlorure de cuivre-II a été repris par 6 cm³ d'acétate de sodium à 10 %, 6 cm³ d'eau bidistillée, 1 cm³ de pyridine, 5 cm³ de sulfocyanate de potassium à 5 ‰; l'ensemble, introduit dans une ampoule à décantation, est agité avec 2 cm³ de chloroforme redistillé. Nous n'avons pas constaté de coloration verte de notre solvant séparé par le repos.

Un deuxième essai conduit parallèlement, utilisant le réactif sulfo-molybdique, s'est montré tout aussi négatif.

Si les essais préliminaires nous avaient indiqué la présence d'une certaine dose de cuivre, il eût été procédé au dosage de cet élément par la méthode appropriée et tenu compte dans l'appréciation de nos résultats.

IV

MATERIEL

Mais si les réactifs doivent être de tout nécessité exempts de cuivre, il n'est pas moins indispensable que soit proscrit l'usage de tout matériel de cuivre ou de laiton, dont la manipulation pourrait introduire des causes d'erreur. Le bain-marie de cuivre a été remplacé par un bain-marie en tôle galvanisée avec couvercles du même métal.

Les appareils de chauffage étaient des becs Bunsen de fer ou des réchauds à gaz dont l'éjecteur de cuivre avait été remplacé par un éjecteur de plomb, pour éviter la production de cuivre-carbonyl.

Les robinets de gaz et d'eau ont été fréquemment recouverts de vernis, ainsi d'ailleurs que tous les objets de cuivre, si répandus dans les laboratoires.

Les précautions ordinaires ont été prises pour éviter les poussières.

Le matériel de filtration, constitué par des filtres Durieux sans cendres, lavés aux acides chlorhydrique et fluorhydrique, essayé en calcinant deux lots de vingt-cinq filtres chacun, s'est toujours montré exempt de cuivre. D'ailleurs, avant chaque opération, le filtre appliqué sur l'entonnoir était lavé avec 15 cm^3 d'acide chlorhydrique à 20 p. 100 à trois reprises différentes, puis immédiatement après au moyen d'eau bidistillée bouillante employée très largement.

Les capsules de quartz ont été généralement préférées aux capsules de porcelaine, parce que plus résistantes à la calcination, et aussi parce que ces dernières donnent souvent, surtout lorsque les opérations ont été conduites sans pré-

cautions (chauffage trop intense), des combinaisons insolubles de cuivre, vraisemblablement constituées par des silicates, qui teintent le récipient en bleu pâle.

Ainsi que l'avait déjà remarqué M. Golse, l'emploi des capsules de platine est à rejeter, car il y a formation d'alliages au cours des calcinations résistant à l'action dissolvante des acides. Cette remarque a d'ailleurs été confirmée par MM. Lasausse et Frocrain [173-174]. Quoi qu'il en soit, lorsque nous avons dû utiliser des capsules ou des creusets de porcelaine, ces récipients étaient choisis parmi ceux ne présentant aucun défaut de vernissage, neufs, et après une immersion prolongée pendant plusieurs jours dans l'eau nitrique, selon les prescriptions de Guillemet [220].

Nous n'avons pas jugé utile de traiter les récipients de porcelaine par la solution alcoolique d'acétate de sodium, préconisée par les auteurs américains pour l'élimination du cuivre, qu'ils pourraient céder au cours de la calcination. Nous n'avons jamais constaté une libération de ce métal, malgré la mise en œuvre de réactifs ultrasensibles.

Après usage, la verrerie était maintenue soigneusement au contact d'acide chlorhydrique étendu d'eau pendant une dizaine d'heures, puis rincée soigneusement à l'eau bidistillée.

Pour les dessiccations, nous nous sommes exclusivement servi du bain-marie de tôle ou d'une étuve de Wiessnegg à revêtement de porcelaine.

V

METHODES DE DESTRUCTION

Notre travail devant comporter l'étude de l'élimination normale du cuivre quotidiennement absorbé par la voie alimentaire et de celle du métal utilisé dans un but thérapeutique, nous devions envisager les matériaux principaux d'excrétion, à savoir : les urines, les matières fécales, les cheveux.

Le microdosage du cuivre dans les matériaux biologiques par les techniques volumétrique ou colorimétrique que nous nous proposions d'utiliser suppose une destruction préalable de la matière organique.

La plupart des auteurs utilisent l'action de l'acide sulfurique chaud conjuguée à celle de divers réactifs oxydants. C'est ainsi que T. P. Choc et W. H. Adolphe [3] utilisent l'acide sulfurique seul, d'autres ajoutent à l'action de l'acide sulfurique celle de l'acide nitrique ou d'un mélange nitro-perchlorique [9, 10]. Dans certains cas, la destruction est parachevée par addition d'eau oxygénée à 100 volumes (*perhydrol*) [249], de permanganate de potassium [351]. Rees [430], pour la destruction de la matière organique du foie et de ses extraits, utilise l'action conjuguée de l'acide chlorhydrique et du perhydrol, ce qui revient à faire agir du chlore naissant.

Il faut éviter l'attaque nitro-perchlorique, qui, ainsi que nous l'avons vu nous-même, entraîne des pertes considérables en cuivre, pouvant dépasser 50 %, ce qui confirme ce qu'avait annoncé Guillemet relativement à ce mode de destruction. L'attaque sulfo-perchlorique donne de bons résul-

tats, mais la destruction nitro-sulfo-perchlorique conduite selon les données classiques lui est incontestablement supérieure.

Dans un cas comme dans l'autre, ces méthodes nous fournissent en fin d'opération un résidu incolore, mais fortement acide, qu'il est nécessaire de diluer à 1 p. 100 environ d'acide sulfurique pour la précipitation ultérieure, soit sous forme de sulfure, soit sous forme de cuivre métallique déposé par électrolyse. Joignons à cela la difficile purification par distillation de l'acide sulfurique, et on comprendra pourquoi nous avons préféré aux méthodes de destruction par voie humide les méthodes par voie mixte, comprenant une solubilisation en milieu humide oxydant suivie d'une calcination avec addition d'adjuvant, qui, dans certains cas (matières fécales, urines) se trouve être formé extemporanément aux dépens des éléments présents dans le milieu et des réactifs introduits au cours des manipulations.

Ces méthodes, qui peuvent paraître simples au premier abord, sont loin d'être de tout repos. Cependant, conduites comme nous le verrons plus loin, elles permettent d'obtenir, avec un minimum de réactif, une destruction totale du charbon, qui pourrait dissimuler une quantité importante de métal. De plus, le résidu peut être amené sans grande difficulté au degré d'acidité voulu pour la séparation totale du cuivre.

Sans doute peut-on objecter qu'il y a toujours et d'une manière inévitable des pertes en cuivre sous forme de cuivre-carbonyl, mis en évidence par Berthelot et particulièrement étudié par G. Bertrand, car toute destruction de matières organiques comporte une phase réductrice pendant laquelle de l'oxyde de carbone se dégage.

Les pertes en métal seront insensibles, ainsi que nous avons pu nous en rendre compte, si la température de destruction ne dépasse pas 500°. En règle générale, il convient d'éviter de porter même au rouge sombre les résidus en expérience.

Dans les milieux où nous devions opérer, milieux riches en chlorure de sodium, nous pouvions craindre *a priori* (l'expérience l'a prouvé) la formation et la dispersion de chlorure de cuivre-II très volatil, malgré les précautions entourant la calcination. Sans doute pouvions-nous mettre à profit la remarque de Lasausse et Frocrain [174], mais elle exige la mise en œuvre de quantités trop importantes de nitrate de magnésium, nos prises d'essais étant plus massives que celles de ces auteurs.

Aussi nous avons réalisé l'élimination du chlore par traitement à l'acide nitrique concentré et à l'ébullition

VI

METHODES DE SEPARATION

La destruction totale étant acquise, il convient de procéder à la séparation du cuivre, qui se fait généralement sous forme de sulfure de cuivre ou de cuivre métallique.

Le plus généralement elle s'opère en milieu chlorhydrique, plus rarement sulfurique.

Si l'acide sulfhydrique bien lavé par barbotage ne risque pas d'entraîner des causes d'erreur, il a l'inconvénient cependant de donner avec les doses minimes de cuivre un sulfure colloïdal qui ne floculе qu'au bout d'un temps plus ou moins long. De plus, le sulfure de cuivre-II est extrêmement oxydable et son lavage nécessite l'utilisation d'eau bouillie chargée du réactif précipitant. Malgré cette précaution, le précipité, extrêmement divisé, offre une surface d'oxydation considérable à l'air, à tel point qu'il est recommandé de ne jamais laisser le filtre vide de liquide. Il est bien préférable de précipiter le métal sous forme de sulfure de cuivre-I, bien moins oxydable. L'agent de précipitation est alors le thiosulfate de sodium. L'entraînement par englobement dans un précipité de sulfure de mercure constitue de toute évidence la technique la plus appropriée. C'est celle que nous avons adoptée pour sa commodité et sa rapidité. Voici comment elle a été appliquée selon M. Golse :

« La solution cuivrique, dont le volume peut atteindre 1 litre, est mesurée et introduite dans un ballon d'une contenance appropriée, puis additionnée de 10 cm^3 par litre d'acide chlorhydrique

à 20 % et de 2 cm^3 d'une solution aqueuse de chlorure de mercure-II à 13 g. 55 par litre (20 mg. de mercure) pour un volume n'excédant pas 200 cm^3, de 5 cm^3 (50 mg. de mercure) pour un volume supérieur à 200 cm^3.

» On porte à l'ébullition et l'on verse peu à peu 2 cm^3 de solution au dixième de thiosulfate de sodium dans le premier cas, 5 cm^3 dans le second; le mercure et le cuivre passent rapidement sous forme de sulfures. On maintient l'ébullition pendant 15 minutes pour permettre au précipité de s'agglomérer. Le liquide est aussitôt versé dans un vase à filtration chaude et l'on y joint les eaux de lavage nécessaires pour enlever complètement du ballon le précipité resté adhérent aux parois.

» Sans attendre le refroidissement du liquide, on sépare le précipité sur un petit filtre sans plis. Après lavage, le filtre est séché, puis brûlé dans un creuset de porcelaine couvert. L'incinération ne laisse que du sulfure de cuivre-I. Celui-ci est traité, dans le creuset refroidi, par V gouttes d'acide nitrique et autant d'acide chlorhydrique concentré. On recouvre d'un verre de montre et on maintient à la température du bain-marie jusqu'à ce qu'il ne se dégage plus de vapeurs nitreuses. Le verre de montre est alors lavé avec un peu d'acide chlorhydrique concentré que l'on fait tomber dans le creuset. On évapore ensuite à siccité.

» Reprendre par 0 cm^3 5 d'acide chlorhydrique pour éliminer l'acide nitrique, qui fausserait le dosage iodométrique, et évaporer de nouveau à sec. Le cuivre est alors à l'état de chlorure de cuivre-II. »

Il ne reste plus qu'à procéder au dosage, ainsi que nous le verrons dans le chapitre suivant.

Le réducteur qu'est le thiosulfate de sodium, outre les avantages évoqués plus haut, détruit les dernières traces de produits nitreux qui auraient pu échapper à l'élimination par reprises successives à l'acide chlorhydrique.

La centrifugation avec ou sans addition de chloroforme ne représente pas une amélioration malgré les apparences. Sa mise en œuvre, pour être commode, nécessiterait des appa-

reils de dimensions considérables vu l'importance des volumes sur lesquels nous opérons. Néanmoins, dans certains cas très particuliers, le tassement par centrifugation peut se justifier.

L'isolement sous forme métallique est facilement réalisable par une micro-électrolyse conduite selon la technique de Pregl; elle a été mise à profit par Guillemet et Gueritault [208-220]. Cette micro-électrolyse peut être suivie d'une appréciation gravimétrique au moyen d'une microbalance ou d'un traitement par un réactif de seconde main tel que le réactif phospho-molybdique. Outre ces méthodes générales, on a prôné l'utilisation du zinc, qui conduit rapidement, selon Koblianski [291], à un isolement quantitatif du cuivre. Cette particularité a été mise à profit pour le dosage rapide du cuivre dans les aliments.

Malheureusement, cette technique si simple se trouve en défaut, car la plupart des échantillons de poudre de zinc que nous avons examinés se montrent cuprifères.

Les complexes organiques ont été également mis à contribution sous forme de dithizone, de sulfocyanate double de cuivre et de pyridine (E. K. Kallstrom et Hugot [276, 263]).

Ces complexes sont particulièrement utiles pour capter des traces de cuivre réparties dans une grande masse de matériaux.

Quoi qu'il en soit du procédé d'isolement, il ne reste plus qu'à doser le métal par les méthodes les plus appropriées.

VII

METHODES DE DOSAGE

Les méthodes utilisées varient selon la dose de cuivre présumée et relèvent soit du domaine volumétrique, soit du domaine colorimétrique. Nous pouvons envisager trois cas selon que :

A. — Les doses de cuivre sont comprises entre 1 mg. et 1/10 de mg. en solutions très étendues. Le dosage volumétrique leur est applicable.

La méthode consiste à appliquer au cuivre, amené au préalable sous forme de sel de cuivre-II, les opérations ci-après :

a) Précipitation à l'état de sulfocyanate de cuivre-II-dipyridine par additions successives de pyridine et d'une quantité connue de sulfocyanate alcalin;

b) Dissolution du complexe dans le chloroforme;

c) Détermination dans le liquide aqueux de la quantité du sulfocyanate alcalin en excès; de cette quantité on déduit la dose de métal mise en expérience.

Technique :

Elle comprend deux opérations :

1° Séparation du cuivre sous forme de sulfure et transformation de celui-ci en chlorure; cette partie ayant été traitée précédemment, nous nous abstiendrons d'y revenir.

2° Dosage volumétrique proprement dit.

Ce dosage peut être réglé de façon à donner, par lecture du nombre de centimètres cubes de liqueur titrée, le poids en dixième de milligramme du cuivre contenu dans le résidu précédemment obtenu.

Avec des pipettes exactement jaugées, on verse dans le creuset 6 cm ^{3} d'une solution au 1/10 d'acétate de sodium cristallisé et 6 cm ^{3} 1 d'eau distillée. On remue au moyen d'une petite baguette de verre pour bien dissoudre le chlorure de cuivre, puis on prélève exactement 10 cm ^{3} de liquide pour les introduire dans une boule à décanter de 60 cm ^{3} environ.

On ajoute 1 cm ^{3} de pyridine, 5 cm ^{3} de solution de sulfocyanate de potassium à 5 grammes par litre (solution sensiblement N/20), 20 cm ^{3} de chloroforme, et l'on agite. Après séparation du mélange, on enlève le liquide chloroformique, coloré en vert par le sulfocyanate de cuivre-II-dipyridine, et l'on achève l'extraction par deux épuisements successifs avec 10 cm ^{3} de chloroforme.

Le liquide aqueux restant dans la boule contient l'excès de sulfocyanate alcalin. On le fait écouler dans une capsule en verre ou en porcelaine de 200 cm ^{3}. La boule est ensuite lavée à trois reprises avec 5 cm ^{3} d'eau distillée. Les eaux de lavage étant réunies dans la capsule, on fait évaporer le mélange jusqu'à siccité au bain-marie.

En vue d'un essai témoin, on évapore de même dans une autre capsule 5 cm ^{3} de la solution de sulfocyanate employée pour précipiter le cuivre, en présence de 5 cm ^{3} de solution d'acétate de sodium au 1/10.

Pour doser le sulfocyanate contenu dans chaque capsule, on opère de la manière suivante : chaque résidu est redissous dans 5 cm ^{3} d'eau distillée, puis additionné de 20 cm ^{3} de solution d'hypobromite de sodium à 1 cm ^{3} de brome pour 200 cm^3, de formule suivante :

Brome	5 cm ^{3}
Lessive d'hydroxyde de sodium (de d = 1,32-1,36)	50 cm ^{3}
Iodure de potassium	1 g.
Eau distillée	q. s. p. 1 litre

Après quinze minutes de contact, mettre dans les deux capsules 10 cm ^{3} de solution au 1/5 d'iodure de potassium, puis après avoir mélangé 10 cm ^{3} d'acide chlorhydrique dilué au

1/5, chaque mélange est transvasé dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 cm ^{3}. On y joint les eaux de lavage de la capsule. Verser en agitant 25 cm ^{3} de solution N/20 de thiosulfate de sodium; enfin, ajouter au moyen d'une burette graduée la solution N/50 de thiosulfate en quantité exactement nécessaire pour faire disparaître l'iode en excès en ayant soin d'introduire en fin d'opération 1 cm ^{3} d'empois d'amidon récemment préparé. Soient N et n les volumes en cm ^{3} de solution N/50 de thiosulfate employés, le premier dans l'essai relatif au sulfocyanate non combiné au cuivre, le second dans l'essai témoin.

La dose de cuivre contenue dans la prise d'essai est égale à :

$$\frac{1}{10} \times (N - n) \text{ mg.}$$

Elle permet la détermination de doses de cuivre de l'ordre de quelques dixièmes de milligramme.

On peut, avec des prises d'essai moins importantes, arriver à une évaluation exacte du cuivre en procédant colorimétriquement.

B. — Les doses de cuivre sont comprises entre 1/10 et 1/100 de mg.

Lorsqu'il y a moins de 1/10 de milligramme de cuivre dans la prise d'essai, on peut faire l'essai colorimétrique suivant, qui utilise la solubilité du sulfocyanate de cuivre II-dipyridine dans le chloroforme. La solution cuivrique est amenée au volume de 50 cm^3 et introduite dans une boule à décanter avec 1 cm^3 de solution de sulfocyanate de potassium au 1/5. On verse exactement 5 cm ^{3} de chloroforme, on agite vigoureusement; le chloroforme chargé de complexe se colore en vert.

Dans une boule à décanter possédant un tube inférieur aussi identique que possible à celui de la première boule, on verse 50 cm ^{3} d'eau distillée exempte de cuivre (eau redistillée dans un appareil de Pyrex), 0 cm ^{3} 5 de pyridine,

1 cm ^{3} d'une solution de sulfocyanate de potassium au 1/5 et très exactement 5 cm ^{3} de chloroforme.

On ajoute par fraction de demi-centimètre cube une solution de sulfate de cuivre dont 1 cm ^{3} renferme 1/100 de mg. de cuivre (préparée en diluant au 1/100 une solution à 3 g. 9259 par litre de sulfate de cuivre cristallisé), on agite vigoureusement après chaque addition et on examine le chloroforme lorsqu'il s'est bien rassemblé; on s'arrête lorsque les teintes des deux essais sont identiques. Du volume de solution cuivrique employé, on calcule la teneur en cuivre de la prise d'essai.

Cette méthode peut être utilisée pour le dosage du cuivre dans les substances végétales. On verse sur le résidu de l'incinération de l'acide chlorhydrique concentré en quantité suffisante pour recouvrir les cendres et on évapore à siccité au bain-marie.

Le résidu est repris par 10 cm ^{3} d'eau distillée et 0 cm ^{3} 5 de pyridine. Il y a, en général, production d'un précipité coloré en jaune rougeâtre renfermant de l'hydroxyde de fer. On clarifie le mélange par centrifugation et on amène le liquide clair ainsi que les eaux de lavage du dépôt au volume de 50 cm ^{3}. Sur cette solution on effectuera le dosage qui vient d'être décrit.

C. — Les doses de cuivre sont extrêmement faibles.

Pour la caractérisation de très petites quantités de cuivre, le procédé suivant doit son intérêt non seulement à sa grande sensibilité, mais aussi à ce qu'il permet de déceler le cuivre presque instantanément et de façon spécifique, ainsi que l'a montré M. Golse [202] :

« Il est basé :

» 1° Sur la propriété que possèdent les solutions de cyanure alcalin ou d'acide cyanhydrique de réduire les ions cuivriques Cu_{II}, à l'état d'ions cuivreux Cu_{I}, et de donner avec ces derniers, lorsqu'elles sont ajoutées en excès, des complexes solubles;

» 2° Sur celle des composés de cuivre-I de réduire un grand nombre de réactifs oxydants, notamment les solutions acides de molybdates, qu'ils colorent instantanément en bleu.

» On sait que lorsqu'on verse en quantité équivalente une solution de cyanure de potassium dans une solution d'un sel de cuivre-II, le précipité jaunâtre de cyanure de cuivre-II qui se forme au début passe progressivement à l'état de cyanure de cuivre-I, blanc, en donnant du cyanogène :

$$2\ SO^4\ Cu + 4\ CNK = 2\ SO^4K^2 + 2\ (CN)^2\ Cu$$
$$2\ (CN)^2\ Cu = 2\ CN\ Cu + (CN)^2.$$

» La précipitation du cyanure de cuivre-I est empêchée par un excès de solution cyanurée, dans laquelle ce composé est soluble. Il se forme des cyanures doubles solubles, ou plutôt des cuprocyanures, composés complexes dans lesquels le cuivre se trouve dissimulé à la plupart des réactifs des sels de cuivre.

» En solutions très diluées, les sels complexes prenant naissance à partir du cyanure de potassium répondraient, d'après Kunschert, à la composition exprimée par les formules :

$$Cu\ (CN)^3\ K^2 \quad \text{et} \quad Cu\ (CN)^4\ K^3.$$

» Leur formation résulterait des réactions ci-après :

$$CN\ Cu + 2\ CNK = Cu\ (CN)^3\ K^2$$
et
$$CN\ Cu + 3\ CNK = Cu\ (CN)^4\ K^3.$$

» Ainsi amené sous forme d'ions cupro-cyanhydriques, le cuivre conserve la propriété, commune aux sels de cuivre-I, de réduire l'acide molybdique et de donner lieu à la production de bleu de molybdène.

» Une coloration intense apparaît immédiatement lorsqu'à 1 cm³ d'eau distillée exempte de cuivre, additionnée de 1 goutte d'une solution de sulfate de cuivre contenant 1 mg. de cuivre par cm³, on ajoute successivement, en agitant à chaque addition, 0 cm³ 5 d'une solution de cyanure de potas-

sion à 1/2 % et 0 cm³ 5 de réactif sulfo-azoto-molybdique. La dose de cuivre ainsi introduite est sensiblement 0 mg. 05, avec seulement quelques millièmes de milligramme dans le même volume de liquide, celui-ci prend encore une teinte bleue nettement appréciable.

» Toutefois, surtout lorsqu'on pratique cette réaction sur de très faibles doses de cuivre, la teinte obtenue diffère du bleu qui apparaît dans la réduction du réactif molybdique sous l'influence de différents corps oxydables : sels de cuivre-I, d'étain-II, zinc, cuivre, étain, etc. La coloration est bleu verdâtre, tirant d'autant plus sur le vert que la dose de cuivre mise en œuvre est plus faible.

» Il est facile de se rendre compte que cette altération de la teinte du bleu de molybdène tient à la solution de cyanure de potassium. Celle-ci, en effet, lorsqu'on l'additionne de réactif sulfo-azoto-molybdique, se colore en jaune vif et, par superposition de la liqueur obtenue avec des solutions bleues, préparées en réduisant des dilutions du même réactif avec un peu de grenaille de zinc, on réalise des teintes vertes absolument comparables à celles que fournissent les solutions de cuprocyanures obtenues comme il a été dit précédemment.

» Si l'on substitue une solution d'acide cyanhydrique à celle de cyanure de potassium, le cuivre passe également à l'état d'ions cupro-cyanhydriques, et le mélange possède les mêmes propriétés réductrices à l'égard du réactif molybdique; mais, au lieu du mélange de teintes que fournissent les solutions préparées avec du cyanure de potassium, c'est bien la belle coloration bleue, spécifique de la réduction de l'acide molybdique, qui apparaît.

» D'ailleurs, les solutions d'acide cyanhydrique restent incolores lorsqu'on les additionne de réactif sulfo-azoto-molybdique.

» L'altération que subit la réaction dans le premier cas doit donc être attribuée au cyanure de potassium, ou plutôt à une substance étrangère contenue dans ce composé.

» Il suffit, pour en trouver l'explication, de penser que la silice est l'une des impuretés rencontrées le plus fréquemment dans le cyanure de potassium et qu'elle forme avec les solutions acides de molybdate d'ammonium un silico-molybdate colorant vivement le liquide en jaune.

» La coloration bleue que fournit le réactif sulfo-azoto-molybdique avec le cuivre, quand celui-ci a été converti en complexe cupro-cyanhydrique, est l'un des indices les plus sensibles de la présence de traces de métal. On peut baser sur son appréciation une méthode dosimétrique applicable à des teneurs de cuivre extrêmement faibles, mais il faut pour cela ne pas être gêné par la superposition d'une teinte jaune parasite, telle celle qui apparaît lorsqu'on fait usage de solutions de cyanures alcalins.

» Procédé rapide de préparation d'une solution riche en acide cyanhydrique.

» Pour obtenir un réactif cyanhydrique exempt de silice, j'ai eu recours à l'action réductrice qu'exerce l'étain sur le cyanure de mercure en présence de certains sels.

» J'ai montré que l'étain, réducteur énergique des sels mercure-II, mais qui est sans action sur les solutions neutres de cyanure de mercure, décompose cette substance lorsqu'on dissout avec elle certains électrolytes, tels que chlorures, azotates, sulfates alcalins, etc.

» Ces sels ont en effet la propriété de mobiliser le mercure et de faire apparaître en solution des ions mercuriques qui, au contact de l'étain, perdent leur charge électrique et se séparent à l'état métallique, en libérant sous forme d'acide cyanhydrique le cyanogène qui leur était initialement combiné.

» Avec le chlorure de sodium, par exemple, on peut admettre qu'il se forme dans le liquide le composé obtenu cristallisé par Brett et Poggiale, $(CN)^2Hg$, ClNa, et qui,

d'après Geuther, peut être considéré comme la combinaison d'un mercuri-cyanure alcalin avec du chlorure de mercure-II :

$$2\,(CN)^2Hg,\ 2\,ClNa = Hg\,(CN)^4Na^2,\ Cl^2Hg.$$

» La formation de cette combinaison, qui fait passer une partie du mercure à l'état de chlorure, a pour effet de faire apparaître des ions mercuriques et de faire cesser l'état de dissimulation dans lequel se trouve le mercure en combinaison avec l'acide cyanhydrique.

» Les réactions qui s'effectuent au contact de l'étain sont les suivantes :

$$2\,(CN)^2Hg + 2\,ClNa = Hg\,(CN)^4Na^2,\ Cl^2Hg.$$

$$Hg\,(CN)^4Na^2,\ Cl^2Hg + Sn + 2\,H^2O = Hg\,(CN)^4Na^2 + (HO)^2Sn + Hg + 2\,ClH.$$

» Mais l'acide chlorhydrique libéré décompose le mercuri-cyanure suivant l'équation :

$$Hg\,(CN)^4Na^2 + 2\,ClH = (CN)^2Hg + 2\,ClNa + 2\,CNH,$$

ce qui aboutit à :

$$2\,(CN)^2Hg + 2\,ClNa + Sn + 2\,H^2O = (CN)^2Hg + 2\,ClNa + (HO)^2Sn + Hg + 2\,CNH.$$

» Les mêmes réactions continuent à s'effectuer et tendent à décomposer suivant cette dernière équation tout le cyanure de mercure. Elles fournissent une solution dont la teneur en acide cyanhydrique dépend de la quantité initiale de cyanure de mercure, et ne renfermant aucune trace de dérivé soluble de l'étain, puisque celui-ci reste à l'état d'hydroxyde d'étain-II insoluble, mélangé avec le dépôt de mercure.

» Il est à noter que cette décomposition de cyanure de mercure par l'étain n'est provoquée que par la présence de sels capables de faire passer le mercure sous forme de cations. Elle ne se produit pas en présence de sels tels que les iodures ou les bromures alcalins. Leur addition, au lieu de faire apparaître des ions mercuriques, amène le mercure sous

forme d'anions iodomercuriques ou bromomercuriques, dans lesquels le métal reste dissimulé à la plupart de ses réactifs.

» On peut donc, grâce à l'intervention d'un sel de la première catégorie, préparer extemporanément une solution fortement chargée d'acide cyanhydrique.

» Il suffit d'agiter énergiquement 10 grammes de grenaille d'étain avec la solution suivante :

Cyanure de mercure	2 g. 50
Chlorure de sodium	2 g. 50
Eau distillée	q. s. p. 50 cm³

» Le liquide se trouble rapidement et abandonne un dépôt constitué par du mercure réduit et de l'hydroxyde d'étain.

» Filtrer sur un filtre sans pli, en repassant les premières portions écoulées, afin d'obtenir un liquide parfaitement limpide. On s'assure d'ailleurs qu'aucune trace de mercure ou d'hydroxyde d'étain n'a été entraînée en ajoutant à un peu de la solution filtrée quelques gouttes de réactif molybdique. Le mélange doit rester incolore.

» Le réactif ainsi préparé, ajouté à une solution cuivrique, fait passer instantanément le métal à l'état de combinaison cupro-cyanhydrique et, si l'on additionne le mélange de réactif sulfo-azoto-molybdique, c'est bien la teinte caractéristique du bleu de molybdène qui apparaît.

» Il serait intéressant de tirer parti de la facilité avec laquelle les sels de cuivre-II sont réduits par l'acide cyanhydrique en vue d'une détermination quantitative du cuivre, et en particulier d'appliquer au complexe cupro-cyanhydrique le procédé de dosage manganimétrique qui convient à l'oxyde de cuivre-I. Le dosage pourrait d'ailleurs comporter la formation intermédiaire de bleu de molybdène à partir d'une solution de molybdate alcalin en milieu sulfurique; il consisterait alors à mesurer le volume de solution titrée de permanganate nécessaire pour réoxyder ce composé et le ramener à l'état d'acide molybdique.

» Or, il est impossible de faire correspondre à la quantité

de cuivre en expérience un volume proportionnel de liqueur oxydante.

» En milieu sulfurique, l'oxydation de cyanure de cuivre-I qui se trouve combiné sous forme d'acide cupro-cyanhydrique se fait conformément à l'équation suivante :

$$2\,CNCu + 2\,SO^4H^2 + O = 2\,SO^4Cu + 2\,CNH + H^2O.$$

» Elle a pour conséquence de remettre le cuivre à l'état de sel de cuivre-II, qui se retrouve dans le mélange en présence du même excès d'acide cyanhydrique qu'à l'origine; il est donc réduit à nouveau sous forme de complexe cupro-cyanhydrique.

» L'oxydation semble devoir se reproduire indéfiniment. Elle est cependant limitée par la production de sulfate de manganèse, qui résulte de la réduction du permanganate. Les sels de manganèse donnent, en effet, avec les cyanures alcalins, des cyanures doubles, ou plutôt des mangano-cyanures renfermant le cyanogène et le manganèse à l'état d'anions complexes. Ainsi, le mangano-cyanure soluble, $Mn\,(CN)^6K^4$, apparaît quand un sel de manganèse est mis en présence d'un excès de cyanure de potassium. En milieu acide, c'est l'acide mangano-cyanhydrique correspondant qui se forme. Si le milieu renferme un sel de cuivre, on voit qu'un équilibre s'établit entre les deux complexes cupro-cyanhydrique et mangano-cyanhydrique; à cet équilibre correspond l'arrêt de l'oxydation du premier par la solution permanganique.

» Le dosage oxydimétrique du cuivre, réduit à l'état de cyanure de cuivre-I, ne peut donc s'effectuer en présence d'acide cyanhydrique.

» *Dosage colorimétrique.*

» La réaction que donne le complexe cupro-cyanhydrique avec le réactif sulfo-azoto-molybdique se manifeste par des colorations d'une telle intensité qu'elle permet d'apprécier un millième de milligramme de cuivre.

» Suivant que la quantité de cuivre à doser est de l'ordre du centième ou du millième de milligramme, on s'adressera à l'une ou l'autre des deux techniques suivantes :

» 1° Pour des doses de cuivre de l'ordre du centième de milligramme.

» En partant, comme solution-mère, d'une solution de sulfate de cuivre cristallisé à 3 g. 928 par litre, faite avec de l'eau distillée exempte de cuivre, on prépare la dilution suivante :

Solution de sulfate de cuivre crist. à 3 g. 928 par litre.	5 cm³
Eau distillée pure ..... q. s. p.	100 cm³

» 0 mg. 01 de cuivre se trouve contenu dans 0 cm³ 2 de cette solution.

» En vue de préparer une série d'étalons colorés, on choisit 11 tubes à essais de 15-16 millimètres de diamètre, également calibrés et aussi peu colorés que possible; ces tubes sont numérotés respectivement 0, 1, 2, ..., 9 et 10.

» Chacun reçoit la dose de cuivre indiquée par son numéro d'ordre, soit 0 cm³ 2 de la dilution pour le tube 1, 0 cm³ 4 pour le tube 2, etc. On ajoute ensuite dans tous les tubes la quantité d'eau distillée pure nécessaire pour égaler le volume à 5 cm³. On met donc 5 cm³ d'eau distillée dans le tube 0, 4 cm³ 8 dans le tube 1, 4 cm³ 6 dans le tube 2, etc.

» Ajouter 2 cm³ de la solution cyanhydrique; agiter pour bien mélanger. Enfin, mettre 2 cm³ de réactif sulfo-azoto-molybdique et agiter de nouveau.

» Les liquides contenus dans ces tubes, à l'exception de celui du tube 0, qui doit être incolore, présentent une teinte bleue en rapport avec la dose de cuivre qu'ils renferment.

» Par comparaison avec ces colorations, on peut donc évaluer en centièmes de milligramme des doses de cuivre n'excédant pas 0 mg. 1; il faut seulement qu'elles soient diluées dans un volume au plus égal à 5 cm³, afin que le mélange de la solution avec les réactifs soit le même que dans les tubes

étalons. En cas de volume inférieur, on compléterait avec de l'eau distillée pure, comme il a été indiqué pour la préparation des étalons. Introduire les réactifs cyanhydrique et molybdique aux mêmes volumes et dans les mêmes conditions; rapporter finalement l'intensité de la teinte produite à celle de l'un des tubes de la gamme d'étalons.

» L'emploi d'étalons colorés préparés comme il vient d'être indiqué ne permet d'évaluation exacte que si les mélanges sont examinés très peu de temps après leur préparation, car leur teinte s'affaiblit rapidement.

» Mais on peut réaliser des colorations bleues identiques à celles que donne la réduction du réactif molybdique par simple mélange des solutions suivantes :

(*a*) Solution aqueuse de rouge Congo à 0 g. 10 p. 100 .... 2 cm³
Eau distillée ..... q. s. p. 50 cm³
(*b*) Solution N/20 d'acide sulfurique.

» En mélangeant 5 cm³ de solution (*a*) avec 4 cm³ de solution (*b*), on a une teinte identique à celle que donne 5 cm³ d'une dilution renfermant 0 mg. 10 de cuivre avec 2 cm³ de chacun des réactifs cyanhydrique et molybdique; mais, à l'encontre de celle du bleu de molybdène, la coloration ainsi obtenue est fixe pendant plusieurs heures.

» 0 cm³ 5 de solution (*a*) amenée au volume de 9 cm³ par addition de solution (*b*) correspond à 0 mg. 01 de cuivre. Il suffit donc, pour préparer les étalons colorés, de mettre 0 cm³ 5 de solution (*a*) dans le tube 1, 1 cm³ dans le tube 2, ..., 5 cm³ dans le tube 10, puis d'ajouter le volume nécessaire de solution (*b*) pour avoir dans chaque tube 9 cm³ de liquide.

» Lorsqu'on dispose d'une gamme ainsi préparée, les liquides bleus, fournis par actions successives des réactifs cyanhydrique et molybdique sur les dilutions de sels de cuivre à examiner, sont immédiatement classés par rapport aux étalons.

» 2° **Pour des doses de cuivre de l'ordre du millième de milligramme.**

» Une nouvelle gamme d'étalons est préparée à partir des deux mêmes solutions (*a*) et (*b*) utilisées précédemment.

» Dans une série de tubes marqués 0, 2, 4, ..., 18 et 20, on introduit des volumes de solution (*a*) correspondant respectivement au nombre de millièmes de milligramme de cuivre indiqué par le numéro de chaque tube, soit 0 cm³ 1 dans le tube 2, 0 cm³ 2 dans le tube 4, ..., 1 cm³ dans le tube 20.

» Dans le tube 0, on met seulement 2 cm³ de solution acide (*b*); dans les autres, on en ajoute la quantité nécessaire pour porter le volume du liquide à 2 cm³.

» Des doses de cuivre comprises entre 0 et 0 mg. 020 peuvent être évaluées par comparaison à l'aide de cette gamme. Il suffit que le volume de solution les contenant ne dépasse pas 1 cm³ et, s'il est inférieur à 1 cm³, d'amener à ce volume par addition d'eau distillée exempte de cuivre. En le mélangeant successivement avec 0 cm³ 5 de réactif cyanhydrique et avec 0 cm³ 5 de réactif sulfo-azoto-molybdique, on obtient un liquide dont la teinte bleue est aussitôt comparée à celle des tubes étalons. » (Golse.)

VIII

EXAMEN DES EXCRETAS

A. — *Destruction de l'urine.*

La destruction de l'urine s'est montrée très laborieuse et n'a été mise au point qu'après une série d'essais plutôt décevants. La technique nitro-sulfurique de Denigès [117] donne sans doute d'excellents résultats, mais aboutit à l'obtention d'un résidu trop riche en acide qu'il faut neutraliser par de l'ammoniaque ou bien encore diluer fortement. De plus, elle est dispendieuse, car elle consomme bien près d'un demi-litre d'acide nitrique à 40° Baumé par litre d'urine pour arriver au résultat cherché. Nous avons pensé à faire directement de l'urine un extrait qui serait ensuite calciné malgré la présence de fortes quantités de chlorure de sodium qui doivent entraîner *a priori* des pertes considérables par volatilisation, outre que la concentration dure fort longtemps et doit être conduite avec un luxe de précautions qui souvent n'évite pas les projections. Néanmoins, nous avons fait des essais dans cette voie. L'urine a été évaporée au bain de sable ou au bain-marie, ce qui exige des délais plus longs, dans des capsules en quartz de 128 mm. de diamètre et de 24 mm. de hauteur. Il est prudent de ne pas concentrer dans une seule capsule un volume supérieur à 500 cm^3, surtout lorsque la densité dépasse 1,025, sinon la masse se boursoufle et déborde. Sur la fin, il est bon de surveiller l'opération et de briser la croûte isolante au moyen d'une baguette de

verre. L'extrait ainsi obtenu est maintenu au bain de sable tant qu'il se dégage des vapeurs blanchâtres. Quand elles ont cessé, la capsule est mise à refroidir sur plaque d'amiante. On verse 5 à 10 cm³ d'acide nitrique redistillé; il se dégage du chlore et du chlorure de nitrosyle. La capsule est alors portée au bain-marie, maintenue jusqu'à cessation de vapeurs, reprise encore deux fois par une nouvelle quantité d'acide nitrique égale à la première, et laissée au bain-marie pendant une heure encore après dégagement de vapeurs. On procède alors à la calcination à basse température. La masse s'enflamme sans provoquer de pertes par projections; on retire du feu, laisse refroidir, ajoute quelques centimètres cubes d'acide nitrique sur la masse charbonneuse, et évapore au bain-marie. Les points noirs sont arrosés à nouveau d'acide nitrique et calcinés jusqu'à obtention d'une masse absolument blanche. Le résidu refroidi, repris par de l'acide chlorhydrique à 20 p. 100, est évaporé à sec au bain-marie. Le traitement est répété deux fois pour chasser les vapeurs nitreuses. On redissout dans une quantité suffisante d'acide chlorhydrique à 20 p. 100, filtre et ajoute au filtrat une quantité suffisante d'ammoniaque pure jusqu'à précipité permanent de phosphate alcalino-terreux. La méthode des quantités ajoutées nous a prouvé le peu de valeur de cette technique, que nous avons essayé d'améliorer en tenant compte des remarques de Lasausse et Frocrain [173], relatives à la fixation du cuivre en présence de fortes quantités de chlorure de sodium quand la calcination est opérée en présence d'oxyde ou de nitrate de magnésium. Les résultats dans cette direction n'ont pas été très satisfaisants; l'extrait mélangé au nitrate de magnésium présente une calcination explosive qui entraîne des pertes inévitables. Nous avons alors songé à concentrer l'urine à ébullition en présence d'acide nitrique.

Un litre d'urine est introduit dans une capsule de porcelaine avec 100 cm³ d'acide nitrique; on recouvre d'un entonnoir et porte à l'ébullition. La concentration se fait régu-

lièrement jusqu'à obtention d'un volume voisin de 100 cm^3 présentant une coloration jaune pâle. L'opération est poursuivie en chauffant avec prudence jusqu'à ce que le volume résiduel montre une ébullition vive sans projections. On ajoute à dix reprises différentes 10 cm^3 d'acide nitrique pour parfaire l'élimination des chlorures et laisse refroidir. Le résidu refroidi est transvasé dans un ballon de Kjeldahl, concentré à feu nu en agitant en permanence. A un moment donné, la masse s'enflamme en faisant des projections tandis que la presque totalité des particules charbonneuses disparaît.

Ce procédé, sans doute rapide, n'est pas exempt de critique; il est bien rare, en effet, que l'on puisse aller jusqu'au bout de la destruction sans rupture de ballon. Les nitrates alcalins formés transitoirement subissent, lors de l'inflammation de la masse, une décomposition qui les transforme en nitrites et en oxydes correspondants. Par suite de phénomènes de rétraction, la masse adhérant à la paroi du ballon entraîne pour ainsi dire à coup sûr la rupture de ce dernier. Ce phénomène physique de rétraction est nettement apparent; la croûte blanchâtre, homogène à chaud, se fendille en même temps qu'on perçoit un bruissement caractéristique. L'addition d'acide nitrique peut empêcher la production de tels phénomènes, mais, devant être faite à température assez haute, elle entraîne elle aussi la rupture du ballon. De plus les pertes par volatilisation sont considérables, ainsi que l'indique la méthode des quantités ajoutées.

Nous avons essayé, par addition de certains adjuvants, de modifier la consistance de ce résidu salin, en particulier par l'addition de nitrate de magnésium. Cependant, nous avons été amené à considérer que les petites doses de ce sel n'étaient pas capables de provoquer une amélioration dans le sens cherché. Des doses considérables sont absolument nécessaires. Leur addition provoquant de multiples inconvénients, nous avons abandonné les essais tentés en ce sens. Au contraire, l'emploi de capsules de quartz dans lesquelles

était transvasée l'urine préalablement attaquée à l'acide nitrique nous a donné toute satisfaction. La capsule et son contenu sont placés sur une plaque de carton d'amiante chauffée très légèrement; la concentration s'opère et on obtient bientôt dans la capsule un résidu pâteux ou cristallin selon les urines mises en œuvre. La dessiccation finalement obtenue, nous procédons à une calcination modérée qui, vu la désagrégation avancée de la matière organique sous l'action de l'acide nitrique bouillant, se traduit par l'apparition de fumées blanches, tandis que la masse subit la fusion pâteuse au cours de laquelle on voit disparaître progressivement les particules charbonneuses. La capsule refroidie est additionnée à nouveau d'acide nitrique et chauffée comme précédemment. Cette dernière phase de l'opération est répétée aussi souvent qu'il est nécessaire pour obtenir un résidu blanchâtre. Ce dernier est calciné jusqu'à cessation du dégagement de vapeurs nitreuses et obtention d'une masse sèche. Le résidu est alors repris par de l'eau et de l'acide chlorhydrique, évaporé à plusieurs reprises au bain-marie pour éliminer les produits nitrés et la petite quantité de silice provenant de l'attaque de la capsule, puis filtré. Il ne reste plus qu'à précipiter et doser le cuivre. Par cette technique, nous avons retrouvé 95 à 96 % du cuivre qui avait été ajouté intentionnellement. La fixation du métal par le récipient est à peu près nulle; elle est entravée par la présence d'un résidu salin important, ce qui confirme des remarques antérieures de différents auteurs.

Dans l'abondante floraison de travaux traitant de la détermination du cuivre dans les différents milieux biologiques, nous avons trouvé en définitive fort peu de documents se rapportant à l'urine. Il semble que l'élimination du cuivre par cette voie n'ait pas retenu l'attention des chercheurs. Peut-être considéraient-ils à priori cette voie d'excrétion comme entièrement négligeable par rapport à la voie biliaire. Il était pourtant normal d'admettre qu'une petite partie du métal pouvait se trouver ainsi excrétée.

Rabinovitch [412, 413], utilisant la méthode de Mc Farlane [149] au diéthyl-dithiocarbamate avec extraction de la matière colorante au moyen d'alcool amylique, a donné des chiffres relatifs à la teneur en cuivre de ce liquide excrémentiel. Sa technique de destruction nitrosulfoperchlorique est celle de Ansbacher, Remington et Culp [10] et porte sur un volume de 100 cm³ d'urine amené à consistance pâteuse par évaporation, suivie d'une précipitation sous forme de sulfure et transformation en nitrate. Les résultats obtenus par cet auteur sont, en général, plus élevés que les nôtres, puisqu'ils vont de traces à 0, 41 mg. par litre et 0,7 mg. par 24 heures. L'auteur note, ainsi que nous l'avons remarqué, que l'ingestion de cuivre, sans donner aucune précision sur sa nature, augmente l'excrétion urinaire.

L. S. Thompsett [530], reprenant en 1934 cette question par une technique analogue de destruction, mais sans concentration préalable, conduite dans un Kjeldahl, détermine le cuivre sans isolement préalable sous forme de sulfure. Pour éviter la précipitation du phosphate de chaux qui s'insolubiliserait en milieu alcalin, il ajoute une quantité suffisante de citrate de sodium, et, pour masquer l'action interférente du fer ou du manganèse, bloque ces deux métaux par addition de pyrophosphate de sodium. Il termine par un dosage colorimétrique selon la technique de Mc Farlane. Les résultats obtenus par cet auteur sont aussi nettement plus élevés que les nôtres et oscillent entre 0 mg. 08 et 0 mg. 48.

Plus récemment, Ross et Rabinovitch [414], étudiant l'urine de l'enfant, ont montré que le cuivre excrété oscillait entre 0 mg. 04 et 0 mg. 52 par litre, avec une moyenne de 0 mg. 3.

Le tableau I réunit les résultats obtenus en suivant les méthodes exposées dans le cours de ce chapitre.

TABLEAU I

Urines de grand mélange provenant de sujets soumis à des régimes variés (le nombre de sujets n'étant pas inférieur à 20).

NUMÉRO D'ORDRE	VOLUME EN EXPÉRIENCE	CUIVRE en mg. par litre
1	1.000	0,02
2	»	0,025
3	»	0,08
4	»	0,05
5	»	0,035
6	»	0,03
7	»	0,12
8	»	0,08
9	»	0,14
10	»	0,045
11	»	0,08
12	»	0,03
13	»	0,03
14	»	0,05
15	»	0,05
16	»	0,12
17	»	0,15
18	»	0,12
19	»	0,08
20	»	1,56
21	»	0,06
22	»	0,045
23	»	0,08
24	»	0,04
25	»	0,03
26	»	0,30
27	»	0,50
28	»	0,10
29	»	0,25
30	»	0,10
31	»	0,15
32	»	0,07

Le cuivre existe donc dans les urines d'une manière constante et en faible quantité. Les chiffres trouvés sont extrêmement variables, malgré le mode de récolte qui ne parvient pas à compenser les variations individuelles. Il nous faut noter un chiffre tout à fait exceptionnel de 1 mg. 56, complètement aberrant et jamais retrouvé par la suite, dépassant

très nettement les chiffres extrêmes trouvés par Rabinovitch et Thompsett. La fréquence des résultats inférieurs au dixième de milligramme est frappante.

B. — *Destruction des matières fécales.*

La destruction des matières fécales est incontestablement plus facile à effectuer que celle de l'urine et nous a exposé à moins de déboires. La totalité des fèces correspondant à une période de 24 heures a été recueillie dans une capsule à fond plat préalablement tarée, ce qui permet d'apprécier le poids de substance fraîche. Malgré l'intérêt évident qu'il y a à connaître le poids de substance sèche, soit pour l'expression des résultats, soit pour la mise sur pied d'un protocole expérimental rigoureux en vue de la destruction, cette détermination analytique n'a pas été faite vu son incommodité, sa longueur, son peu de précision (obligation d'opérer dans des capsules lourdes et volumineuses). Quoi qu'il en soit, la matière fécale est traitée selon son degré apparent de consistance par son volume d'acide nitrique redistillé si la substance paraît relativement sèche, et son demi-volume si l'on a affaire à une selle pâteuse ou liquide. Le récipient est porté au bain-marie ou, si l'on veut gagner du temps, chauffé à feu nu en agitant d'une manière permanente pour éviter une carbonisation partielle de la masse au contact de la paroi, carbonisation qui pourrait amener une rupture de la capsule. L'opération doit être conduite avec une flamme semi-chauffante. Dès l'addition d'acide nitrique, la masse commence à se fluidifier en même temps qu'elle prend une coloration brune et qu'elle se désodorise à peu près complètement. Puis, à mesure que la température monte, il se produit une mousse abondante assez persistante qu'il faut briser au moyen d'une baguette de verre pour éviter son débordement. Au bout de cinq minutes environ, il apparaît dans la masse de grosses bulles de vapeurs nitreuses.

Ce résultat acquis, le chauffage peut être intensifié. Des

vapeurs rutilantes plus abondantes se dégagent pendant cette phase de l'opération, tandis que commence une ébullition tranquille que l'on poursuit sans chercher à obtenir toutefois l'homogénéisation totale de la masse, qui demanderait pour sa réalisation l'addition de quantités importantes d'acide nitrique. Le liquide, sans séparation des graisses, assez peu abondantes en général, et des débris alimentaires, cellulosiques pour la plupart, qui ont résisté à la dissolution nitrique, est introduit par portions dans un ballon de Kjeldahl de capacité convenable. La concentration est opérée à feu nu en agitant continuellement pour éviter une surchauffe. Au début, il se dégage de la vapeur d'eau et peu de vapeurs nitreuses, puis au fur et à mesure qu'elle se poursuit, ces dernières se font plus abondantes. A un certain moment, leur émission cesse et se trouve remplacée par des fumées blanches présentant l'odeur irritante d'acroléine provenant de la décomposition des graisses; en même temps, le résidu resté dans le ballon charbonne abondamment. L'apparition de gouttelettes huileuses et noirâtres sur les parois du ballon constitue le terme de l'opération. Le ballon, refroidi avec les précautions d'usage, reçoit à nouveau une portion du liquide à détruire qui est concentrée dans les conditions précisées plus haut. Il en est ainsi jusqu'à épuisement de la totalité de la masse à détruire. Le résidu charbonneux est repris selon son importance par des volumes variables d'acide nitrique redistillé et chauffé à nouveau avec les mêmes précautions. Au troisième ou quatrième traitement, la masse s'enflamme dès qu'elle a atteint un certain degré de siccité, sans faire de projections. Les cendres sont reprises après refroidissement par de l'acide nitrique et calcinées jusqu'à obtention d'une masse exempte de points noirs. On aboutit ainsi à des cendres blanc jaunâtre (cette coloration est due à la présence de sels de fer-III) qu'on chauffe jusqu'à cessation de dégagement de vapeurs rutilantes. Le résidu, toujours adhérent à la paroi du ballon, se redissout à peu près complètement dans l'acide nitrique pur et l'acide

chlorhydrique à 20 %. Dans cette destruction, il est absolument inutile d'ajouter du nitrate de magnésie, car il y a, en effet, suffisamment de bases alcalino-terreuses (OCa) dans le milieu pour former transitoirement les nitrates nécessaires à la bonne marche de la combustion. Le résidu resté dans le ballon est alors repris par quantité suffisante d'acide chlorhydrique à 20 %; on agite et porte à ébullition. La masse se détache de la paroi. Il est extrêmement rare que l'on obtienne une solution totale, car il y a dans le milieu une quantité de sable plus ou moins abondante, selon les selles, et de la silice à l'état colloïdal. Le ballon est rincé au moyen d'acide chlorhydrique et d'eau jusqu'à élimination totale de son contenu. L'ensemble des liquides est recueilli dans une capsule de porcelaine qu'on porte au bain-marie, évaporé par trois fois en reprenant chaque fois avec de l'acide chlorhydrique pour avoir l'élimination totale des produits nitreux et l'insolubilisation de la silice. On redissout alors dans de l'eau chlorhydrique, porte à l'ébullition et filtre. Le filtrat, plus ou moins coloré en jaune par la présence de sels de fer-III, est additionné d'ammoniaque pure pour obtenir un précipité permanent de phosphates alcalino-terreux qu'on redissout à l'ébullition par addition ménagée d'acide chlorhydrique à 20 %. On ajoute en supplément 1 cm³ de ce dernier réactif par 100 cm³ de solution. Le cuivre est alors précipité et dosé volumétriquement ainsi qu'il a été dit précédemment. Le plus généralement, le volume final dans lequel nous opérons la précipitation est aux environs de 400 cm³. Par le procédé exposé plus haut, la destruction de la matière est rapide et permet d'obtenir la minéralisation complète de 300 grammes de matières fécales au taux moyen de 75 % d'hydratation, en deux heures environ, avec une dépense d'acide nitrique qui ne dépasse pas 50 à 60 cm³ pour 100 g.

La concentration de la première liqueur nitrique au bain-marie dans une capsule plate est extrêmement lente et risque d'entraîner vers la fin des projections nombreuses,

la calcination ultérieure d'un tel résidu se montre toujours explosive, et c'est pour cette raison que nous avons préféré le ballon de Kjeldahl à tout autre récipient. Ce dernier résiste admirablement aux traitements assez brutaux auxquels il est soumis à la condition de ne lui imposer que l'action d'une flamme semi-chauffante.

La valeur de la méthode de destruction ainsi préconisée a été éprouvée en ajoutant à des poids égaux de matières fécales des quantités connues de cuivre (solution de sulfate de cuivre à 3,928 g. par litre). Par comparaison avec les témoins, nous avons retrouvé 95 à 96 % du cuivre ainsi surajouté, prouvant de la sorte la valeur de notre technique. A côté de cette méthode, nous avons pu éprouver une méthode plus rapide et presque aussi exacte basée sur la colorimétrie.

Elle a été pratiquée de la manière suivante. Les matières fécales correspondant à une période de 24 heures sont soigneusement homogénéisées au mortier après pesée. On en prélève alors le dixième en vue de la destruction, qui est conduite comme dans le cas précédent. Lorsque tout le charbon a disparu et que le résidu traité par l'acide chlorhydrique a été amené au volume de 15 cm^3, on procède au transvasement dans un tube de centrifugeuse. L'acidité du milieu étant saturée par de la pyridine, on ajoute encore 1 ou 2 cm^3 de ce réactif. Le tube est laissé au repos pendant un quart d'heure, puis centrifugé à grande vitesse jusqu'à tassement complet. Le liquide incolore surnageant le dépôt gélatineux blanc ocracé est décanté dans un ballon jaugé de 50 cm^3. Le dépôt, remis en suspension dans de l'eau pyridinée à 10 % (10 cm^3), est centrifugé à nouveau. Le liquide décanté est réuni au premier. L'ensemble, complété à 50 cm^3, permet alors le dosage colorimétrique, sous forme de sulfocyanate de cuivre-II-dipyridine. Selon l'importance de la dose de cuivre, il est prélevé 5 ou 10 cm^3 ou même un volume plus important.

En dépit des nombreux travaux, pour la plupart étrangers,

traitant de la présence du cuivre dans les milieux biologiques, nous avons trouvé fort peu de documents se rapportant à l'élimination fécale humaine. En 1896, Filehne [160] l'avait étudiée sur les chiens et les chats, plus récemment Flinn et Inouye [166], Lindow, Peterson et Steenbock [330] en 1929, et Guillemet [217] en 1933, chez le rat au point de vue quantitatif. Le cuivre avait été retrouvé par spectrographie dans le méconium des nouveau-nés [417, 420, 384, 130, 197, 275]. Il était pourtant normal de penser que l'intestin était une voie d'excrétion choisie, puisque l'on savait que chez l'homme et les animaux la bile contenait du cuivre de manière constante. De plus, sa présence en grande abondance était connue depuis longtemps dans les calculs et sables biliaires [247, 353].

TABLEAU II

Cuivre fécal (Sujets ingérant des régimes variés).

NUMÉRO D'ORDRE	POIDS DE MATIÈRE FRAICHE en g.	CUIVRE en mg.
1	170	0,84
2	127	0,84
3	45	0,66
4	87	0,50
5	80	1,60
6	162	0,30
7	127	0,72
8	88	0,88
9	64	0,63
10	405	2
11	215	1,21
12	97	1,62
13	124	0,94
14	160	2,51
15	60	1,58
16	80	1,14
17	115	0,82
18	213	0,61
19	162	0,83
20	147	0,45
21	35	0,41
22	35	0,32

Le cuivre existe d'une manière constante et appréciable dans les matières fécales. Le poids de cuivre éliminé varie selon les sujets et selon le régime, comme nous le verrons ultérieurement. Il ne semble pas exister de relation étroite entre le poids de matières fécales fraîches et le cuivre excrété.

IX

CUIVRE CAPILLAIRE

Aux voies d'élimination intestinale et rénale vient s'en ajouter une troisième, qui a son importance. Elle est constituée par les cheveux, production dérivée de l'épiderme, qui contiennent une quantité non négligeable de cuivre.

La destruction des cheveux n'est pas facile à opérer sans le secours d'un adjuvant, vu la pauvreté du milieu en matière minérale. Sans doute, la calcination dans une capsule de porcelaine ou de quartz, à une température inférieure à celle du rouge sombre, conduit-elle à de bons résultats, mais elle est longue, pénible, réclame de multiples reprises par l'acide nitrique, suivies d'évaporations. Aussi avons-nous préféré solubiliser par l'acide nitrique la prise d'essai et l'introduire par petites portions dans un Kjeldahl contenant 1 g. de nitrate de magnésium. Le résidu obtenu dans l'opération précédente est traité par la méthode générale de séparation en vue du dosage.

Comme le montrent les chiffres du tableau III, le cuivre injecté à titre médicamenteux se localise au moins en partie dans les cheveux.

TABLEAU III

Cuivre dans les cheveux.

		Cu en mg. p. 1.000 de matières fraîches
N° 1	Avant traitement	9,5
N° 2	Avant traitement	10,15
N° 3	Avant traitement	8,5
N° 4	Avant traitement	12,3
N° 5	Avant traitement	11,16
	Après traitement	21
N° 6	Avant traitement	9,5
	Après traitement	14

Le cuivre existe d'une manière constante dans les cheveux, ainsi que l'avaient déjà remarqué divers auteurs. Ils s'y localise plus particulièrement à la suite d'une thérapeutique cuivrique et d'une manière très nette.

Dans les deux cas rapportés, le traitement consistait en injections de sulfate de cuivre ammoniacal (4 cg. pendant 10 jours), soit 100 mg. de cuivre au total. Le prélèvement des matériaux a été fait trois semaines après la fin du traitement.

Conclusions.

Des nombreux essais auxquels nous nous sommes livré, il résulte que les voies d'excrétion du cuivre sont la voie rénale et surtout la voie intestinale. Il y a aussi localisation dans les cheveux et élimination subséquente par cette voie. Dès maintenant, nous pouvons dire que le cuivre des cheveux augmente à la suite de l'injection de cuivre thérapeutique, tel que le sulfate de cuivre ammoniacal, et dans certains cas nous avons vu la teneur de ce métal passer presque du simple au double.

X

ETUDE DES FACTEURS CONDITIONNANT L'EXCRETION DU CUIVRE

Les résultats précédents acquis, nous avons voulu nous rendre compte des éléments qui conditionnent l'excrétion du cuivre, des relations qui existent entre le cuivre fécal et urinaire, et enfin de l'influence de l'absorption de cuivre minéral, soit par ingestion, soit par injection.

Il est permis de penser que le cuivre éliminé par la voie rénale est directement issu du milieu sanguin, tandis que le cuivre intestinal semble être d'une origine plus complexe. Ce dernier est constitué tout d'abord par le cuivre des débris alimentaires qui n'ont pas été absorbés, auquel vient s'ajouter celui vraisemblablement sécrété par l'intestin lui-même au niveau du côlon et celui qui a été véritablement métabolisé, qui se trouve déversé dans le contenu intestinal par les sucs digestifs, en particulier par la bile; mais il est impossible, sauf quelques cas exceptionnels, de connaître le volume de bile excrété quotidiennement.

Sans doute est-il permis, par un tubage duodénal au moyen de la sonde d'Einhorn, de se rendre compte de l'excrétion du cuivre à un moment déterminé, sous réserve que la technique suivie pour le prélèvement ne modifie pas la teneur en cuivre de la bile. De plus, il est très admissible que le cuivre ainsi déversé dans l'intestin soit réabsorbé en cours de route. Nous sommes complètement désarmé pour établir la part exacte qui revient à chacun de ces facteurs. Nous ne pouvons.

en définitive, apprécier que la résultante, et c'est pourquoi nous sommes arrivé à la conception d'un bilan cuivrique qui établira la balance entre les apports des ingesta et les pertes par excreta.

Pressentant l'importance du flux biliaire dans l'élimination fécale du cuivre, nous avons soumis des sujets à un même régime alimentaire de teneur constante en cuivre pendant une période de 5 jours pour suivre leur excrétion quotidienne. Le cinquième jour, un purgatif cholagogue (30 g. de sulfate de sodium) leur a été administré. Les résultats sont consignés dans le tableau suivant.

TABLEAU IV

Sujets soumis au même régime alimentaire pendant une période de cinq jours. Administration d'un purgatif le cinquième jour.

VOLUME URINAIRE en cm³	Cu URINAIRE en mg.	MATIÈRES FÉCALES en g.	Cu FÉCAL en mg.	TOTAL en mg.
N° 1 :				
1.100	0,06	121	1,61	1,67
1.000	0,05	160	1,75	1,80
1.200	0,07	130	1,55	1,62
1.200	0,06	120	1,30	1,36
1.200	0,03	490	2,4	2,43
N° 2 :				
800	0,06	160	0,93	0,99
1.100	0,04	190	0,82	0,86
1.200	0,07	187	1,12	1,19
1.000	0,04	123	1,34	1,38
1.200	0,03	427	2,30	2,33

L'administration d'un purgatif cholagogue détermine toujours une augmentation de l'excrétion fécale du cuivre, qui semble bien conditionnée par l'abondance du flux biliaire.

L'élimination urinaire ne semble pas très impressionnée par une élimination fécale accrue. D'autre part, chez des sujets soumis à un même régime, l'excrétion fécale du cuivre

apparaît très irrégulière. Nous en trouverons d'ailleurs d'autres exemples dans la suite.

N.-B. — La correspondance des excreta aux ingesta a toujours été établie au moyen des procédés classiques (poudre de charbon ou carmin).

*
* *

D'autre part, des sujets ingérant des régimes donnés de teneur constante en cuivre pendant la durée de la période d'épreuve voient leur cuivre urinaire rester à peu près constant et indépendant de la diurèse.

TABLEAU V

Cuivre urinaire (le régime, pendant toute la durée de l'épreuve, reste le même pour chaque sujet).

VOLUME URINAIRE en cm³	Cu URINAIRE en mg.	OBSERVATIONS
N° 1 :		
750	0,04	La diurèse est produite par l'ingestion d'eau bidistillée exempte de cuivre.
1.000	0,05	
1.300	0,03	
1.100	0,04	
1.200	0,04	
N° 2 :		
1.200	0,04	
1.500	0,06	
1.300	0,03	
N° 3 :		
1.100	0,03	
1.200	0,03	
850	0,04	

Nous avons voulu nous rendre compte s'il existait une relation entre le cuivre urinaire et le cuivre fécal. Nous avons expérimenté sur des sujets soumis à des régimes donnés de teneur constante en cuivre pendant des périodes variables, le plus généralement d'une durée de trois jours.

TABLEAU VI

Cuivre total éliminé par un sujet à un régime donné pendant une période d'une journée.

NUMÉROS	VOLUME URINAIRE en cm3	Cu URINAIRE en mg.	MATIÈRES FÉCALES en g.	Cu FÉCAL en mg.	TOTAL en mg.
1	1.300	0,04	82	0,22	0,26
2	3.000	0,08	180	1,05	1,10
3	2.400	0,207	35	0,41	0,617
4	2.100	0,15	192	4	4,15

Cuivre total éliminé par un sujet à un régime donné pendant une période de trois jours.

NUMÉROS	VOLUME URINAIRE en cm3	Cu URINAIRE en mg.	MATIÈRES FÉCALES en g.	Cu FÉCAL en mg.	TOTAL en mg.
1	1.000	0,10	283	4,70	4,80
	1.100	0,10	305	1,17	1,27
	860	0,10	130	0,63	0,73
2	1.200	0,08	125	1,95	2,07
	1.400	0,11	95	2,05	2,16
	900	0,07	75	1,41	1,48
3	700	0,06	100	0,95	1,01
	1.200	0,09	165	0,80	0,89
	1 000	0,12	120	1,10	1,22
4	1.200	0,12	120	1,51	1,63
	1.400	0,08	160	1,22	1,30
	1.100	0,09	95	1,34	1,43
5	2 400	0,207	35	0,41	0,617
	2.400	0,161	35	0,32	0,481
	1.840	0,250	58	0,157	0,407
6	1.000	0,25	351	7	7,25
	920	0,03	137	3	3,03
	1.000	0 05	122	3	3,05
7	930	0,15	145	3	3,15
	1.080	0,075	106	1,25	1,325
	1.470	0,05	177	2,5	2,55
8	540	0,02	135	3	3,02
	900	0,04	289	5	5,04
	1.310	0,04	174	2,5	2,54
9	540	0,05	80	3	3,05
	650		90	1,5	»
	700	0,03	110	2,5	2,53
10	700	0,075	57	1,75	1,825
	670	0,05	154	2	2,05
	550	0,05	162	2	2,05
11	1.360	0,35	151	1,5	1,85
	980	0,08	215	2	2,08
	1.420	0,075	167	2	2,075

Chez les quatre premiers sujets, le cuivre urinaire paraît indépendant de la diurèse et assez variable selon le régime. Le cinquième sujet est nettement aberrant; il s'agit d'un individu présentant une constipation opiniâtre. Les selles se présentent sous forme de scybales de petit volume et très consistantes. Il est probable que les chiffres du cuivre urinaire, très élevés par rapport aux moyennes précédemment trouvées, sont dus à une résorption intense par la muqueuse intestinale. Ce fait est à rapprocher de l'excrétion accrue par administration de purgatifs.

De plus, l'élimination apparaît très irrégulière. Certains sujets donnent pour un même régime des éliminations du même ordre à peu près constantes, cependant que d'autres accusent des divergences considérables. De tous ces résultats contradictoires, il est difficile de tirer des conclusions nettes. Il est vraisemblable que la complexité du mécanisme présidant à l'excrétion du cuivre est à la base de ces différences. Il suffit qu'un des éléments de ce mécanisme subisse une activation ou un ralentissement dans son fonctionnement pour entraîner alors de fortes divergences.

En règle générale, le cuivre fécal est toujours plus abondant que le cuivre urinaire. Il n'y a pas de relation simple et nettement apparente entre le cuivre ressortissant à ces deux origines.

Dans une autre série d'expériences faisant l'objet du tableau VII, nous avons administré du cuivre minéral, sous forme de sulfate, à des sujets soumis à un régime donné. Nous avons toujours constaté une augmentation nette du cuivre fécal et du cuivre urinaire, ainsi que le prouvent les chiffres portés plus bas.

TABLEAU VII

Cuivre total éliminé après absorption de 5 mg. de cuivre minéral (sulfate de cuivre), le sujet ingérant le même régime pendant la période préparatoire de deux jours et la période d'examen, d'une durée de six jours.

	Cu URINAIRE en mg.	Cu FÉCAL en mg.	Cu TOTAL en mg.	OBSERVATIONS
1er SUJET				
1er jour.....	»	0,95	»	
2e jour.....	0	0,90	»	Période préparatoire
3e jour.....	0,18	3,60	3,78	5 mg. de cuivre le 3e et le 4e jour.
4e jour.....	0,15	4,24	4,39	
5e jour.....	0,13	0,93	1,06	
6e jour.....	0,04	0,47	0,51	
7e jour.....	0,05	2,12	2,17	
8e jour.....	0,05	0,39	0,44	
2e SUJET				
1er jour.....	»	1,31		
2e jour.....	0,06	1,40	1,46	
3e jour.....	0,13	4,1	4,23	Période préparatoire : 5 mg. de cuivre le 3e jour.
4e jour.....	0,08	2	2,08	
5e jour.....	0,05	2,10	2,15	
6e jour.....	0,05	1,60	1,65	

Chez un sujet à un régime donné, l'ingestion de cuivre minéral augmente nettement l'excrétion urinaire et fécale du cuivre.

Après d'innombrables essais chimiothérapiques appliqués à différentes affections (tuberculose, lèpre), les sels de cuivre ne sont plus guère utilisés que dans le traitement de certaines manifestations cutanées provoquées par le streptocoque ou le staphylocoque [58] et dans l'anémie avec un réel succès. Nous avions pensé à un certain moment étudier l'élimination du cinnamate de cuivre de Feron et Lanchen [159], qui se montre actif dans le traitement de la lèpre; mais on lui a substitué, avec succès semble-t-il, un traitement mixte à base de savon total de chaulmoogra et de bleu de méthylène.

TABLEAU VIII

Cuivre total éliminé par un sujet à un régime donné, pendant une période de cinq jours. Le sel cuivrique est le sulfate de cuivre ammoniacal en solution à 4 %.

Nos	VOLUME URINAIRE en cm³	Cu URINAIRE en mg.	MATIÈRES FÉCALES en g.	Cu FÉCAL en mg.	TOTAL en mg.	OBSERVATIONS
1	1.500	0,04	82	0,22	0,26	30 mg. de cuivre injectés.
2	750	0,04	294	0,41	0,45	
3	1.150	0,04	65	3,21	3,25	
4	500	0,04	109	2,37	2,41	
5	1.750	0,03	152	2,82	2,85	
1	3.000	0,03	180	0,55	0,58	30 mg. de cuivre injectés.
2	3.000	0,02	188	0,61	0,63	
3	3.195	0,03	220	0,12	0,15	
4	2.700	0,02	192	2,54	2,56	
5	2.800	0,02	130	3,7	3,72	
6	2.350	0,03	200	2,76	2,79	
7	3.000	0,04	305	1,51	1,55	
1	2.400	0,20	35	0,41	0,61	10 mg. de cuivre injectés pendant 10 jours.
2	2.400	0,16	35	0,32	0,48	
3	1.840	0,25	58	0,15	0,40	
4	2.150	0,08	40	0,33	0,41	
5	2.100	0,40	40	0,21	0,61	
6	2.100	0,05	35	0,26	0,31	
7	2.600	0,20	20	0,18	0,38	
8	2.000	0,04	85	0,40	0,44	
9	2.100	0,03	71	0,49	0,52	
10	2.100	0,40	50	0,43	0,83	
11	2.250	0,08	130	0,70	0,78	
12	1.800	»	70	0,48	»	
13	1.800	0,05	25	0,34	0,39	
14	1.800	0,03				
1	»	0,03	»	0,35	0,38	10 mg. injectés pendant 10 jours
2	»	0,03	»	0,64	0,67	
3	»	0,04	»	0,79	0,83	
4	»	0,02	»	0,56	0,58	
5	»	0,02	»	1,54	1,56	
6	»	0,05	»	0,43	0,48	
7	»	0,03	»	0,60	0,63	
8	»	0,14	»	0,56	0,70	
9	»	0,12	»	0,84	0,96	
10	»	0,05	»	1,57	1,62	
11	»	0,03	»	2,17	2,20	
12	»	0,03	»	2,23	2,26	
13	»	0,03	»	1,13	1,16	

On explique d'ailleurs l'efficacité de la méthode de Whipple [515], à base de foie de bœuf et de veau, par la richesse particulière de ces organes en cuivre [430] à l'état normal.

D'ailleurs ce métal existe, comme on devait le prévoir, dans un grand nombre de médicaments chimiques et galéniques, ainsi que l'ont montré M. Golse, Hugot, et des auteurs étrangers [5, 8, 40, 55, 57, 61, 62, 79, 86, 127, 128, 148, 150, 156, 181, 200, 205, 245, 246, 264, 271, 273, 283, 334, 347, 362, 363, 365, 383, 385, 386, 418, 421, 430, 507, 511, 531, 541].

L'injection de sulfate de cuivre ammoniacal détermine en général une augmentation du cuivre fécal et du cuivre urinaire. L'élimination se fait lentement, ce qui confirme les travaux de Mayençon et Bergeret [39]. Ces auteurs avaient constaté :

1° que le sulfate de cuivre ammoniacal s'absorbe promptement;

2° qu'il se diffuse dans tout l'organisme, mais que certains organes (foie et cerveau) semblent le fixer plus abondamment;

3° que l'élimination de ce sel est lente et se fait par l'urine et la bile. Nous avons aussi noté (tableau III) qu'il y avait localisation dans les cheveux.

Avec ce que nous savons de l'élimination du cuivre, ce n'est pas tant l'augmentation de l'excrétion que sa régularité prolongée qui nous permet de conclure ainsi que nous le faisions plus haut (tableau VIII).

XI

BILAN CUIVRIQUE

L'établissement d'un bilan cuivrique était indispensable pour l'étude du métabolisme complet du cuivre. Nous avons soumis pendant plusieurs jours un individu à un régime de teneur exactement connue en cuivre et dosé les quantités de métal éliminées chaque jour, mais la réalisation d'une telle expérience doit être faite dans certaines conditions rigoureuses pour être exempte de toute critique. Il convient, outre l'exactitude des méthodes de dosage, de choisir judicieusement l'alimentation à donner au sujet et de délimiter les excrétas sur lesquels les investigations vont porter.

A. — *Alimentation du sujet.*

Il convient évidemment de choisir des aliments qui peuvent être pesés, mesurés rigoureusement et présentant un haut degré d'homogénéité, de telle sorte qu'un échantillon moyen soit bien représentatif de l'ensemble. L'usage des purées de légumes ou de fruits, viandes de charcuterie ou de boucherie faciles à homogénéiser, du lait et de ses dérivés, sont particulièrement recommandables. En ce qui concerne les boissons, le patient ingère du vin, de l'eau ordinaire, de la bière ou de la limonade. Les eaux minérales, en particulier les eaux de Vichy, ont été soigneusement exclues du régime, car elles avaient une influence nette sur l'élimination rénale du cuivre administré par la voie digestive (Desgrez [123, 193 à 196]).

Nous ne pensons pas qu'une telle épreuve puisse être d'une durée inférieure à 6 ou 7 jours. Nous distinguons une période préliminaire de 3 jours, dite période de préparation, qui permet au malade d'évacuer les excrétas des aliments ingérés avant l'essai (néanmoins, le sujet ingère la ration type pendant cette période) et une période définitive, d'une durée de 3 jours également, pendant laquelle sont recueillies les matières fécales et les urines.

B. — *Délimitation des excreta se rapportant à la période d'épreuve.*

Deux cas sont à considérer selon qu'il s'agit d'un malade à selles régulières et émises quotidiennement à heures fixes. En cette occurrence, il n'y a aucune difficulté; au contraire, si l'élimination intestinale est capricieuse, on fait appel à des tests indicateurs. On fait ingérer le matin du premier jour et le matin du quatrième jour de la période définitive 25 cg. de charbon. Les cachets sont ingérés au cours du premier petit déjeuner. Les matières fécales sont recueillies à partir du moment où elles sont colorées en noir et jusqu'à ce qu'elles apparaissent non colorées. Il ne reste plus à ce moment qu'à détruire la matière organique et à procéder au dosage du cuivre.

***

Nous avions pensé, au début, nous basant sur les résultats tabulaires donnés par les auteurs français et étrangers [2, 12, 71, 91, 94, 125, 140, 142, 147, 198, 204, 205, 255, 331, 350, 434, 485, 486, 514, 546] et sur nos propres résultats analytiques, à faire une étude statistique portant sur un grand nombre de sujets (nous avions la bonne fortune d'avoir près de nous une collectivité assez importante soumise à un même régime alimentaire. Nous nous sommes vite rendu compte que, malgré les affirmations [2, 140] des différents auteurs, les échantillons de matières alimentaires présentaient entre

eux des différences considérables, sans compter les causes de contamination extrêmement nombreuses, surtout pendant la période de préparation de la ration [2, 166].

Certaines pratiques culinaires concernant la cuisson des viandes ou des légumes interviennent pour diminuer dans des proportions considérables le cuivre contenu initialement. C'est ainsi que les viandes subissant une perte de leurs sucs pendant la préparation voient tomber leur cuivre dans une proportion qui n'est souvent pas inférieure à 25 p. 100. Les légumes préparés à l'eau subissent également une perte considérable, ainsi que nous avons pu nous en rendre compte.

Force nous était donc de recourir à l'expérimentation directe en dosant le cuivre dans les ingesta; la constitution de stocks de denrées alimentaires dans lesquelles le cuivre eût été dosé une fois pour toutes s'étant montrée très difficilement réalisable.

Voici néanmoins quelques chiffres touchant les aliments courants que nous avons examinés :

Nature de l'aliment.	Cu en mg. par kg. de matière sèche
Carotte	13
Haricots rouges	12
Haricots blancs	10
Marrons	4
Foie de bœuf	12
Foie de veau	21

Les résultats obtenus ne font que confirmer ceux acquis par d'autres auteurs. Les remarques faites plus haut ne nous ont pas incité à poursuivre dans cette voie. Il ne peut être tenu compte des chiffres précédents, étant donné qu'on observe presque toujours des déperditions très variables de cuivre selon le mode de préparation de la ration.

XII

DESTRUCTION DES ALIMENTS

De la ration alimentaire homogénéisée, puis pesée, on prélève le 1/5, qui est introduit dans une capsule de porcelaine avec son poids d'acide nitrique pur redistillé, et on fait bouillir pour solubiliser et amener à faible volume. Ce résultat étant obtenu, nous introduisons la liqueur dans un ballon de Kjeldahl avec 1 g. de nitrate de magnésium. Nous procédons à la destruction et au dosage ainsi qu'il a été décrit précédemment. Les tissus végétaux qui se montrent si résistants à la calcination ordinaire, les matières glucidiques si difficiles à détruire, subissent par ce procédé une minéralisation plus rapide présentant moins de pertes, la température restant toujours relativement basse.

Les boissons telles que la bière ont subi le même traitement après avoir été agitées longtemps et vigoureusement dans un ballon pour éliminer la majeure partie du gaz carbonique, puis chauffées au bain-marie ou à la flamme semi-chauffante pour chasser entièrement le gaz. Ce résultat acquis, la concentration en présence d'acide nitrique est alors entreprise [231, 237, 266, 292, 347, 348, 479].

Le vin, qui est donné comme boisson habituelle, contient des doses variables de cuivre, d'origine endogène et exogène [439, 450], et ceci d'une manière constante. Cela n'est pas pour étonner quand on sait l'usage intensif des anticrypto-

gamiques, le plus souvent à base de sulfate de cuivre ou de parasiticides cuivriques, colloïdaux ou non, et aussi la présence de cuivre dans le matériel vinicole. Abondant dans les moûts [47, 238], il se dépose au cours de la vinification, se trouve éliminé en presque totalité dans les lies [343, 35, 24, 261, 439]. Néanmoins, il en reste toujours en solution une certaine quantité qu'il est intéressant de doser à plusieurs points de vue [440, 542]. La méthode que nous avons suivie est celle de M. Golse [201], qui se recommande par sa simplicité et son exactitude; elle est de beaucoup préférable aux méthodes de Fellenberg, Debordes, Astruc et Castel [16, 112, 157].

Le lait contient, ainsi que Hess, Supplee et Bellis [28] l'ont démontré en 1922, du cuivre d'une manière normale et constante, aussi bien chez la vache que chez la femme. Absorbé pendant la lactation, il servirait à l'enfant à former l'hémoglobine concurremment avec le cuivre accumulé dans son foie pendant la vie fœtale.

Nous nous sommes tout d'abord servi du mode opératoire suivant : 500 ou 1.000 cm³ de lait introduits dans une capsule de porcelaine sont additionnés de 50 ou 100 cm³ d'acide nitrique pur redistillé. Le mélange est chauffé jusqu'à obtention d'un liquide homogène par disparition des grumeaux de caséine. Le liquide est soumis à un refroidissement énergique pour solidifier la graisse, qui est séparée et lavée dans les conditions habituelles, les liquides du premier lavage étant joints au premier liquide. Puis on concentre, la capsule recouverte d'un entonnoir renversé, jusqu'à obtention d'un volume voisin de 100 cm³. Ce point atteint, de l'acide nitrique est de nouveau ajouté sur le résidu qui mousse abondamment et ne doit être chauffé qu'avec précautions. Lorsque la couleur est passée au jaune paille, le résidu est transvasé par petites portions dans un ballon de Kjeldahl contenant 1 g. de nitrate de magnésium cristallisé pour aider à la combustion. Le résidu noir obtenu par la calcination est repris par l'acide nitrique évaporé, calciné

jusqu'à obtention de cendres absolument blanches. Le résidu, repris par l'acide chlorhydrique, évaporé au bain-marie à plusieurs reprises pour éliminer les produits nitreux, est redissous dans l'eau chlorhydrique, additionné d'ammoniaque jusqu'à précipité persistant, puis, selon le volume, d'une quantité variable d'acide chlorhydrique à 20 %, à raison de 1 cm³ d'acide par 100 cm³ de solution. Le cuivre est précipité et dosé selon les techniques habituelles.

Ce mode opératoire a l'inconvénient d'être long, d'introduire des manipulations supplémentaires, telles que l'élimination des graisses et le transvasement, aussi avons-nous préféré, après quelques essais, le procédé suivant :

La prise d'essai est introduite dans un ballon de Kjeldahl de volume approprié à l'importance de la prise, puis de quelques centimètres cubes d'acide acétique redistillé pour coaguler la caséine. Le liquide est concentré à feu nu jusqu'à obtention d'un extrait, la chauffe étant conduite très prudemment sur la fin; le résidu est additionné de nitrate de magnésium et d'acide nitrique; la minéralisation est obtenue en définitive de la même manière que précédemment. Les résultats moyens donnent 0 mg. 12 de cuivre par litre de lait pur, recueillis dans des conditions qui excluent toute souillure accidentelle. La méthode des quantités ajoutées nous a permis d'apprécier la valeur de notre technique de destruction, qui est plus simple que celle de Lilian K. Conn, A. H. Johnson, A. Trebler et V. Karpenko, qui, n'éliminant pas les chlorures, risque d'entraîner des pertes par volatilisation et dissimulation par calcination incomplète. Ces auteurs terminent le dosage après séparation sous forme de sulfure ou par électrolyse et estimation colorimétrique au diéthylthiocarbamate de Délépine. Gebhart et Sommer [189, 190], opérant la destruction dans des conditions analogues, terminent le dosage selon la technique de d'Elvehjem et Lindow [139] au sulfocyanate complexe de cuivre et de pyridine (modification de la technique de Biazzo).

En opérant ainsi, nous avons trouvé des chiffres qui s'éta-

gent de 0,1 à 0,2 mg. avec une fréquence marquée, de 0 mg. 12. Les différents auteurs étrangers qui se sont occupés de la même question trouvent 0 mg. 11 pour le lait cru, 0 mg. 22 pour le lait pasteurisé, la dose de cuivre variant selon la température et la durée de la pasteurisation. Dans le lait de femme, on trouvait de 0 mg.. 22 à 0 mg. 28; dans le lait de chèvre, 0 mg. 15, et dans la crème de lait de vache, 0 mg. 28 à 0 mg. 45. Selon Elvehjem, Steenbock et Hart [142], 0 mg. 15 serait la dose habituelle de ce métal dans le lait de vache. Les mêmes auteurs insistent sur le fait qu'ils n'ont trouvé aucune différence selon l'origine du lait et que l'ingestion de cuivre ne se traduirait pas par une excrétion augmentée. Quam et Hellwig [239, 240] donnent comme résultats 0 mg. 2 à 0 mg. 5 pour le lait de vache et de chèvre, 2 mg. 5 pour la crème. King et Etzel [147], de 0 g. 40 à 0 g. 72 par 1.000.000. Krauss et Washburn [310], de 0 mg. 14 à 0 mg. 17 par litre; Zondek et Bondurain [45], de 0 mg. 15 à 0 mg. 20 pour le lait de vache, de 0 mg. 5 à 0 mg. 6 pour le lait humain; Davies [108, 109, 110], de 0 mg. 15 à 0 mg. 65 pour le lait frais; de 0 g. 4 à 4 p. 1.000.000 pour le lait stérilisé; Rémy [435, 436]; pour le lait de vache, 0,13; pour le lait humain, 0,14; pour le lait de chèvre, 0,99. Grimmer [206] : pour le lait cru 0,11; pour le lait pasteurisé, 0,32; pour la crème, 0,28 à 0,45; pour le lait humain, 0,22 à 0,28; pour le lait de chèvre, 0,15.

De cet ensemble imposant de résultats analytiques, nous pouvons conclure que la dose de cuivre maxima du lait de vache se tient aux environs de 0 mg. 2, avec, comme nous le disons plus haut, une fréquence très marquée aux environs de 0 mg. 12. Encore convient-il de se tenir à l'abri de toute contamination. Les assertions de Elvehjem, Steenbock et Hart ne sont exactes qu'à la condition que la récolte du lait soit faite dans des récipients de porcelaine ou de verre. Cette attaque serait due à l'acide lactique. Nous avons constaté qu'un lait neutralisé à la phtaléine et maintenu en contact plus ou moins prolongé avec un récipient en cuivre

avait un pouvoir dissolvant propre non imputable uniquement aux éléments acides.

Les auteurs américains, en particulier, dans une foule de travaux, ont insisté sur le pouvoir dissolvant du lait sur le cuivre et ses alliages les plus divers [24, 44, 59, 60, 68, 83, 103, 109, 110, 111, 113, 147, 158, 161, 188, 189, 204, 206, 239, 240, 252, 296, 307, 308, 309, 310, 311, 322, 323, 389, 404, 408, 409, 410, 422, 423, 443, 469, 549] et montré que le goût de graisse constaté dans le lait et les produits qui en dérivent était dû à une teneur particulièrement élevée en ce métal; que, d'autre part, ce métal intervenait dans la réaction de Storch et la teneur en vitamines C. Nous avons donc soumis des sujets, pendant des périodes variables, à une alimentation lactée de teneur contrôlée en cuivre. Nous avons toujours obtenu des bilans négatifs; l'excrétion cuivrique l'emporte sur l'ingestion, la différence diminuant de plus en plus au fur et à mesure de la prolongation du régime. Il ne semble pas qu'il y ait là une action spécifique due au régime lacté; elle s'explique plus simplement par le fait d'une économie en cuivre de l'organisme (tableau IX).

Quoi qu'il en soit, au moyen de régimes mixtes, nous avons tenté à plusieurs reprises de mettre un sujet en état d'équilibre cuivrique sans jamais y réussir d'une manière parfaite. Le cuivre éliminé étant sous la dépendance du cuivre ingéré, il est difficile de fixer un taux même approximatif de la quantité de cuivre nécessaire pour l'organisme. Nous pensons toutefois, avec T. P. Chou et W. H. Adolphe [3] qu'une dose de 1,5 à 2 mg. doit être considérée comme la mieux adaptée.

Au régime mixte, des sujets de même âge soumis au même régime alimentaire donnent des résultats extrêmement divers. Les uns présentent des bilans positifs, d'autres des bilans négatifs, sans cause apparente. Nous avons vu un même sujet, ingérant un régime donné, présenter tantôt un bilan positif, tantôt un bilan négatif (tableau X).

Il n'y a pas lieu de s'étonner de telles divergences si on

se souvient de la complexité du mécanisme présidant à l'excrétion du cuivre; le plus généralement les bilans se montrent légèrement négatifs. L'organisme provoque la rétention de petites quantités de cuivre nécessaires sans doute à la bonne marche de certaines réactions catalytiques, à la régénération de son hémoglobine et de ses globules rouges, sur lesquels le cuivre aurait une action heureuse d'après certains auteurs, américains pour la plupart, nulle d'après d'autres.

TABLEAU IX

1° Cuivre du lait.

NUMÉRO D'ORDRE	VOLUME EN EXPÉRIENCE en cm³	Cu en mg.
1	1.000	0,20
2	»	0,12
3	»	0,12
4	»	0,14
5	500	0,11
6	250	0,12

2° Sujets au régime lacté intégral.

	Cu INGÉRÉ en mg.	Cu URINAIRE en mg.	Cu FÉCAL en mg.	TOTAL en mg.
1er jour.....	0,24	0,06	0,60	0,66
2e jour.....	0,30	0,06	0,50	0,56
3e jour.....	0,28	0,03	0,40	0,43

Au régime lacté intégral, le sujet présente un bilan négatif qui va en s'atténuant à mesure que le régime se prolonge.

TABLEAU X

Bilan cuivrique (Sujets au régime mixte).

	Cu INGÉRÉ PAR 24 HEURES en mg.	Cu ÉLIMINÉ en mg.	DIFFÉRENCES en mg.
Ier Sujet :			
1er jour	1,71	0,175	+ 1,535
2e jour	2,63	0,85	+ 1,78
3e jour	2,56	1,47	+ 1,09
IIe Sujet :			
1er jour	1,53	1,24	+ 0,29
2e jour	1,81	1,60	+ 0,21
3e jour	1,72	1,78	— 0,06
IIIe Sujet :			
1er jour	0,93	1,10	— 0,17
2e jour	1,28	1,25	+ 0,03
3e jour	1,75	1,60	+ 0,15
IVe Sujet :			
1er jour	1,5	1,8	— 0,3
2e jour	1,8	0,95	+ 0,35
3e jour	1,5	1,2	+ 0,3
Ve Sujet :			
1er jour	1,50	0,93	+ 0,57
2e jour	1,50	1,20	+ 0,30
3e jour	1,50	1,10	+ 0,40

XIII

ETUDE DE LA LOCALISATION DU CUIVRE CHEZ L'ANIMAL NORMAL ET INTOXIQUE

La deuxième partie de notre travail a pour but l'étude de la répartition du cuivre chez l'animal normal et après intoxication par le sulfate de cuivre injecté ou ingéré. L'animal a été préalablement anesthésié au Numal (15 cg. au kilo), et sacrifié par section des gros vaisseaux aboutissant au cœur. Les organes ont été prélevés entiers et sans avoir été débarrassés des graisses et des tissus conjonctifs qui peuvent fixer le toxique en plus ou moins grande quantité. La dessiccation n'a pas été pratiquée, non pas qu'elle soit considérée comme inutile, mais bien plutôt comme difficile à réaliser pleinement.

La méthode de destruction suivie est celle indiquée par M. Golse [202], inspirée de celle préconisée par Fontès et Thivolle pour le microdosage du fer dans les tissus, et dans laquelle interviennent successivement comme agents de destruction l'acide azotique et la magnésie.

La méthode d'incinération sans addition d'adjuvant est des plus critiquables; sans doute permet-elle d'éviter toute erreur due à l'impureté des réactifs, mais c'est là un avantage illusoire quand on sait que, par une purification préalable, il est permis d'avoir à sa disposition des réactifs absolument exempts de cuivre. C'est pour cette raison que nous avons négligé les indications données par Desgrez [123]. De plus, que penser des indications données par cet auteur pour la précipitation et le dosage quand on sait que pour l'une aucun degré d'acidité, même approximatif n'est fixé, et que pour

l'autre la détermination gravimétrique se fait en transformant le sulfure de cuivre-II en sulfure de cuivre-I par chauffage en présence d'un excès de soufre, ou en oxyde de cuivre-II par calcination et transformation transitoire en nitrate de cuivre.

Nos déterminations ont été conduites suivant la méthode volumétrique ou colorimétrique, selon les doses de métal contenues dans les organes en expérience. Pour nous faire une idée de l'ordre de grandeur des quantités à doser, nous avons d'abord expérimenté sur le chien normal.

Nos résultats sont consignés dans les tableaux suivants :

TABLEAU XI

ORGANES	POIDS en g.	Cu en mg.
CHIEN N° I. — Poids : 26 kg 500.		
Estomac	175	0,1
Intestin	630	0,4
Foie	535	10,58
Rate	85	0,045
Thyroïdes	6	0,02
Cœur	188	0,31
Pancréas	48	0,017
Reins	133	0,03
Testicules	40	0,04
Langue	85	0,16
Vessie	48	0,02
Poumons	242	0,22
Sang	288	0,20
CHIEN N° II. — Poids : 25 kg.		
Estomac	240	0,22
Intestin	453	0,19
Foie	525	35,51
Rate	180	0,4
Cœur	208	0,2
Pancréas	40	0,017
Reins	147	0,41
Testicules	50	0,03
Langue	113	0,1
Œsophage	45	0,18
Vessie	68	0,04
Poumons	238	0,19
Sang	535	0,31

Les examens précédents nous ayant averti de la particulière richesse du foie en cuivre, nous avons prélevé chez 4 chiens ce même organe en vue de la détermination du métal.

TABLEAU XII

	FOIE Poids en g.	Cu en g. POUR LA TOTALITÉ de l'organe.
CHIEN N° III..... (Poids : 22 kg. 500)	645	8,5
CHIEN N° IV ..... (Poids : 15 kg. 250)	499	10,4
CHIEN N° V ..... (Poids : 17 kg. 400)	429	8,28
CHIEN N° VI ..... (Poids : 16 kg. 500)	430	6,55

Ces organes se révèlent donc particulièrement riches en cuivre, quoique présentant des variations individuelles considérables, attribuables peut-être à une alimentation particulièrement riche en ce métal.

Nous avons eu, au cours de nos expériences, la bonne fortune d'avoir à notre disposition des utérus gravides, qui nous ont permis la détermination du cuivre dans ces organes et les fœtus qu'ils contenaient.

TABLEAU XIII

		Cu correspondant mg.
CHIENNE N° I .		
Utérus.....	749 g.	0,158
Fœtus.....	292 g. (4 fœtus)	0,05
CHIENNE N° II .		
Utérus.....	700 g.	0,265
Fœtus.....	80 g. (4 fœtus)	0,05

Les résultats précédents nous montrent qu'aux différents stades de leur développement les fœtus contiennent du cuivre qui a passé par la voie placentaire.

*
* *

Localisation du cuivre chez l'animal intoxiqué.

A. — **Par injection intraveineuse.**

La répartition du cuivre chez l'animal normal ayant été étudiée, nous avons alors procédé à l'intoxication des chiens soit par la voie intraveineuse, soit par la voie stomacale. L'agent toxique choisi a été dans tous les cas le sulfate de cuivre-II cristallisé avec 5 molécules d'eau. En ce qui concerne les animaux intoxiqués par la voie parentérale, la voie d'introduction est toujours la même, à savoir les veines des pattes postérieures, d'un accès très facile. Nous ajouterons que l'animal avait été préalablement anesthésié au Numal. Les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux ci-joints :

TABLEAU XIV

Chien n° VII. — Poids : 28 kg.

ORGANES	POIDS en g.	Cu correspondant en mg.
Estomac	248	6,66
Intestin	222	8
Foie :		
Lobe droit	329	97
Lobe gauche	216	3,26
Lobe antérieur	83	7
Lobe postérieur	23	3,6
Rate	124	2
Cœur	277	7,35
Pancréas	44	0,31
Reins	178	5,65
Testicules	35	0,425
Verge	38	0,40
Œsophage	51	0,31
Sang	200	2,25
Vésicule biliaire	19	0,07
Urine	202	0,25

Ce chien a reçu 2 g. 50 de sulfate de cuivre par la voie intraveineuse. La mort est survenue dans 10 minutes sans aucun vomissement, avec relâchement du sphincter anal, sans émission de matières fécales.

TABLEAU XV

Chienne n° VIII. — Poids : 6 kg. 500.

ORGANES	POIDS en g.	Cu correspondant en mg.
Estomac	165	10
Intestin	314	5,65
Foie — Lobe droit	92	6,5
Foie — Lobe gauche	176	4
Foie — Lobe antérieur	192	6,5
Foie — Lobe postérieur	49	5,1
Rate	61	0,15
Cœur	55	3,25
Pancréas	32	0,15
Reins	60	6
Œsophage	19	1
Vessie	9	0,16
Poumons	97	11,3
Vésicule biliaire	5	1,2
Corps thyroïde	9	0,02

Cet animal a été intoxiqué comme le précédent. La mort est survenue sept minutes après l'injection, sans vomissements et sans convulsions.

Les quantités de cuivre auxquelles nous avons à faire dans certains cas sont telles que nous avons dû adopter une technique basée sur le dosage de ce métal à l'état de sulfocyanate de cuivre-I.

Voici comment elle a été adaptée par M. Golse :

« La solution à doser, contenant moins de 0 g. 17125 de cuivre, est introduite dans un ballon jaugé de 100 cm³, avec environ 25 cm³ d'eau distillée. On y ajoute 25 cm³ de solution décinormale de sulfocyanate de potassium. La solution prend la teinte verte du sulfocyanate de cuivre-II.

» Au moyen d'une burette, on fait tomber goutte à goutte, en agitant à chaque addition, une solution aqueuse de sulfite

neutre de sodium à 5 g. de sel anhydre pour 100 cm³. Le précipité de sulfocyanate se forme aussitôt et la liqueur perd peu à peu sa coloration. Lorsque le mélange paraît sensiblement décoloré, on laisse déposer le précipité. Si le liquide surnageant est encore teinté, on y ajoute une goutte de la solution de sulfite, et on renouvelle, s'il y a lieu, cette addition jusqu'à ce que le liquide, après agitation et dépôt du précipité, soit tout à fait incolore. Pour assurer une réduction complète, on verse encore une ou deux gouttes de solution sulfitée, et on mélange. Tout le cuivre est ainsi transformé en sulfocyanate de cuivre-I. On verse alors 1 cm³ d'acide chlorhydrique étendu au 1/5, puis, après avoir mélangé, on ajoute 0 g. 25 de carbonate de calcium précipité. On agite pendant quelques instants. L'acidité contenue dans le mélange se sature et produit du gaz carbonique, qui, en se dégageant, entraîne la presque totalité du gaz sulfureux. On complète alors à 100 cm³ avec de l'eau distillée, on agite fortement et on filtre, en repassant s'il y a lieu les premières portions de liquide jusqu'à ce que le filtrat soit absolument limpide. 10 cm³ de filtrat sont introduits dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 cm³ de contenance. Au cas où il subsisterait des traces d'anhydride sulfureux, il est indispensable de les éliminer, car elles interviendraient concurremment avec le sulfocyanate dans la réduction de l'hypobromite de sodium. On pourrait les chasser en maintenant au bain-marie le mélange, préalablement acidifié par de l'acide chlorhydrique, mais il est plus simple de les oxyder par la quantité d'iode qui leur correspond :

$$SO^2 + I^2 + 2\,H^2O = SO^4H^2 + 2\,HI.$$

» Cette oxydation peut être réalisée sans inconvénient en présence de sulfocyanate, qui, en milieu acide, n'est pas altéré par l'iode. Il suffit donc, après addition aux 10 cm³ de liquide, d'une ou deux gouttes d'acide chlorhydrique au 1/5, de faire tomber goutte à goutte, en agitant, une solution étendue d'iode (solution N/20), jusqu'à ce que le mélange

reste faiblement coloré en jaune par une goutte de solution iodée en excès. Il suffit généralement d'une goutte pour que ce résultat soit atteint.

» Le liquide est ensuite rendu alcalin au moyen de une ou deux gouttes de lessive d'hydroxyde de sodium; en même temps, la coloration due à l'iode disparaît. On verse alors 10 cm³ de la solution d'hypobromite de sodium (1).

» Après 15 minutes de contact, on additionne successivement de 10 cm³ de solution d'iodure de potassium à 20 p. 100, et, après mélange, de 10 cm³ d'acide chlorhydrique étendu au 1/5.

» On mesure le volume N cm³ de solution décinormale de thiosulfate de sodium nécessaire pour faire disparaître l'iode libéré.

» Un essai témoin est effectué dans les mêmes conditions sur le produit qui résulte du mélange de 10 cm³ de la solution d'hypobromite, avec 10 cm³ d'une dilution sulfocyanique obtenue en amenant 25 cm³ de solution décinormale de sulfocyanate de potassium au volume de 100 cm³. Si n est le nombre de centimètres cubes de solution décinormale de thiosulfate employés dans cet essai, la différence $(N - n)$, proportionnelle à la quantité de sulfocyanate non précipité par le cuivre, permet de calculer le poids de métal contenu dans les 10 cm³ de liquide. Il suffit pour cela de multiplier cette différence par 0,00079375 g. En multipliant encore par 10, on a la quantité de cuivre qui a été introduite dans la prise d'essai. » (Golse.)

Des résultats précédemment obtenus, nous pouvons admettre la fixation sélective du cuivre par le foie, fixation variable d'ailleurs selon le lobe considéré. Le sang présente un accroissement de sa teneur en cuivre nullement en rapport avec la quantité de métal injectée. Le rein s'enrichit notablement, ainsi que les poumons. Il ne paraît pas y avoir de fixation particulière par les glandes endocrines (thyroïdes).

(1) Il s'agit de la solution concentrée.

B. — Intoxication par la voie stomacale.

L'animal en expérience a reçu du sulfate de cuivre, tout d'abord *per os* au moyen d'une sonde, puis directement dans l'estomac au moyen d'une aiguille de forte dimension. Il a été ainsi donné une dose énorme de sulfate de cuivre. Les 10 g. mis en expérience n'ont provoqué la mort qu'au bout d'une heure, précédée de battements accélérés du cœur et de salivation abondante.

TABLEAU XVI

Chien n° IX. — Poids : 12 kg. 850.

ORGANES	POIDS en g.	Cu correspondant en mg.
Estomac	141	97
Intestin	545	87,78
Foie	507	16,8
Rate	76	45,7
Cœur	121	2,38
Pancréas	38	4,90
Reins	65	32,38
Œsophage	29	3,49
Vessie	236	89,7
Poumons	270	11,9
Vésicule biliaire	9	2,38
Corps thyroïde	15	
Sang	45	9,2
Verge et testicules	64	2,98

La dose de toxique employée très considérable, inondant véritablement l'organisme, et la diffusion du métal dans tous les organes, ne permet pas de tirer de conclusion ferme de cette expérience.

RESUME ET CONCLUSIONS

Après avoir exposé les microréactions du cuivre et décrit minutieusement les précautions qui président au choix d'un matériel approprié et les procédés de purification des réactifs, nous passons à la description des méthodes de destruction. Leur valeur a pu être prouvée d'une manière nette, ainsi que nous l'avons établi.

Nous adressant ensuite aux matériaux d'excrétion (urines, matières fécales, cheveux), nous y mettons en évidence le métal d'une manière constante. Il est en général beaucoup plus abondant dans les matières fécales que dans les urines. Nous avons montré également qu'il n'y avait pas de relations étroites entre les doses de cuivre éliminées par ces deux voies, que le cuivre urinaire semblait être indépendant de la diurèse.

L'importance du flux biliaire dans l'élimination intestinale a été mise en évidence.

L'ingestion de cuivre minéral provoque une excrétion accrue de cuivre total, que l'introduction ait lieu par la voie stomacale ou par la voie intraveineuse. Le cuivre se localise d'autre part dans les cheveux

La quantité totale de cuivre éliminée par un sujet ingérant un régime bien déterminé apparaît très irrégulière, et des chiffres contradictoires obtenus il est impossible de tirer une conclusion quelconque. La cause de cette incertitude réside dans la complexité des éléments qui conditionnent l'élimination fécale.

La méthode des bilans n'a pu que nous confirmer toutes les irrégularités déjà signalées.

Chez le chien normal, les examens montrent la localisation du métal dans le foie, en même temps que sa présence constante dans le placenta et le fœtus.

Chez le chien intoxiqué par la voie parentérale, nous notons la fixation hépatique, variable selon le lobe considéré, ainsi qu'une fixation rénale.

Le passage du toxique du torrent circulatoire aux organes se montre très rapide.

Chez le chien intoxiqué par la voie stomacale, nous pouvons confirmer la toxicité assez peu marquée des sels de cuivre.

Vu : *Le Doyen*,
PIERRE MAURIAC.

Vu, bon a imprimer :
Le Président,
GOLSE.

Vu et permis d'imprimer :
Bordeaux, le 16 février 1937.
Le Recteur de l'Académie,
A. TERRACHER

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. Adan (R.). — *Bull. fed. med. chim. belge*, 1926, 5, 447.
2. Adolph (W. H.) et Chou (T. P.). — *Chem. J. physiol.*, 1933, 185.
3. — *Biochemical J.*, 1935, 29, p. 476.
4. Adolpho (S. A.) — *Ann. farm. bioquem.*, Buenos-Ayres, 1933, 4, 77-80.
5. Aloy et Valdiguie. — *Bull. Soc. Chim.*, 1922, 31, 1176.
6. Amy et Bayle. — *C. R. Acad. Sc.*, 1927, 185, 268-270.
7. Anderson (K. G.) et Nielson (B.). — *Bioch. Z.*, 1933, 261, 22-44.
8. Andreano (N.) et Ansbacher (S.). — *Deut. Med. Wochenschr.*, 1930, 56-357-358.
9. Ansbacher (S.) et Cherbuliez. — *Helv. chim. Acta*, 1930, 13, n° 2, p. 187; *ibid.*, 1920, 2, p. 80.
10. Ansbacher (S.), Remington (R. F.) et Culp (F. B.). — *Ind. Eng. Chem.* (Anal. Edit.), 1931, t. 3, n° 3, p. 314-317.
11. Ansbacher et Andreano. — *Loc. cit.*
12. Aoward Satterfield (G.) et James (S. O.). — *J. Elisha. Mitchell. Sc. Soc.*, 1932, 48, 16.
13. Aphraim (F.). — *Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, 17 sept. 1930, t. 63, n° 8, p. 1928.
14. — *Ibid.*, 1931, t. 64; n° 5, p. 1215-1218.
15. Astin (S.) et Riley (J.-L.). — *J. chem. Soc.*, mars 1933, p. 314-315.
16. Astruc et Castel (A.). — *Ann. Chim. Ann.*, 1935, p. 173; *Progr. Agr. vit.*, 1935, 103, 205-208.
17. Bach. — *C. R. Acad. Sc.*, 1899, 126, p. 363.
18. Balthazard et Lambert. — *Soc. Med. leg.*, 24 nov. 1910.
19. Banthiens (H.). — *Z. Angew. chem.*, 1927, 40, 286.
20. Bassani et Roncato (H.). — *Bull. Abg. chem. Soc. Japan*, 1927, 3, 52.
21. — *Arch. Sc. Italie*, 1934, 19, 541-601.

22. Batsha (B.). — *Z. Physiol. chem.*, 1932, 45, 117.
23. Baudish. — *Chem. Zeit.*, 1909, t. 33, p. 1298.
24. Bauer (R.). — *Forsch. Land.*, 1932, t. 7, n° 1, p. 7-9.
25. Bayle et Amy. — *Loc. cit.*
26. Begemann (H.) et Schoorl (A.). — *Rec. trav. chim. Pays-Pays*, 1925, 44, 1077.
27. Behrens et Bourgeois. — *Anal. qualit. microchimique*, p. 54.
28. Bellis, Heese, Suplee. — *J. Dairy Sc.*, 1922, p. 445.
29. Bencko (V.) et Dubsky. — *Z. anal. Chem.*, 1933, t. 93, p. 19-20.
30. Benedetti (A. A.), Pichier et Spikes (W. F. S.). — *J. Mikrochemie*, 1934, 15, 271-288.
31. Benedicente et Rebella. — *Arch. di farmac. sperimentale*, 24, n° 2, p. 50, in *Bull. sc. Pharm.*, 1919.
32. Benoit. — *Z. Anal. Chem. exptl. Med.*, 1933, 90, 421.
33. Benoit et Derrien. — *Bull. Soc. Chim.*, 1929, t. XLV, p. 690.
34. Benoit. — *Ann. Chim. Anal.*, 1930, p. 65.
35. Benvegnin et Capt. — *Land. Jahrb. Schweiz.*, 1934, 84, 667.
36. Beretta (A.) et Charrier (G.). — *Gaz. chim. ital.*, 56, p. 865.
37. Berg. — *Z. anal. Chem.*, 1927, t. LXX, p. 341.
38. Berg (R.) et Kustenmacher (H.). — *Z. Anaorg. Allg. Chem.*, 1932, t. 204, n^{os} 1-2, p. 215.
39. Bergeret et Mayencon. — *J. Anat. et Phys.*, 1873, p. 225, et 1874, p. 89.
40. Berry (B. O.), Lythgoe (H. C.) et Hall (S. H.). — *Boston med. Lung.*, I, 1926, 194, 984-988.
41. Bey (L.). — *Bull. Soc. Chim. de France*, 1930, t. 47, n° 10, p. 1192.
42. Biazzo. — *Ann. Chim. Appll.*, 1926, 16, 2.
43. Bishop (E. R.) et Otto (J. G.) et Baisden (L.). — *L. Am. Chem. Soc.*, 1934, 56, 408.
44. Bohet. — *Ann. Hyg. publ. Med. Soc.*, 1929, 698.
45. Bondurain et Londek (S. G.). — *Klin. Wochenschr.*, 1931, 10, 1528.
46. Bosc (K. M.) et Ray (P. R.). — *Z. Anal. chem.*, 1933, t. 95, n^{os} 11-12, p. 404.
47. Bouffard (E.) et Hugues (R.). — *Progr. Agr. vit.*, 1934, 102, 639.
48. Bourgeois et Behrens. — *Loc. cit.*
49. Boyd (I. C.) et de N. K. — *Indian. J. Med. research.*, 1933, 20, 189-800.
50. Brenners (H. J.). — *Mikrochem.*, 1931, 3, 385, 94.

51. Briggs (S. H. C.). — *Ztz. f. anorg. chem.*, 56, 908, 260.
52. Briskas (J. B.), Zizine (P.) et Lesne. — *C. R. Soc. biol.*, 1936, t. CXXI, p. 1582, et t. CXXII, p. 532.
53. Brownsett (Th.) et Farrow (F. F.). — *J. Textile inst.*, 1931, 1922, n° 7, p. 357.
54. Bruhns. — *Chem. Zeit.*, 1918, t. XLIII, p. 301.
55. Buchitz et Cavallini (G.). — *Ann. Chim. applicata*, 1934, 24, 266; 1933, 23, 490.
56. Buhtz (G.). — *Deut. Z. ges. gemicht. Med.*, 1932, 18, 609.
57. Bullheimer (E. C.) et Nitardy (F. W.). — *J. Amer. Pharm. Assoc.*, 1932, t. 21, n° 2.
58. Bureau (J.), Lasausse (E.) et Renaud. — *Gaz. Med. Nantes*, mars 1936, 141.
59. Burg (B. Van de). — *Lait*, II, 1931, 946.
60. Burns (L.). — *Milk. plant. Monthly*, 1932, 21, n° 1, 37-42.
61. Burstall (F. H.). — *Brit.*, 25 août 1927, 300-330.
62. Butt (F. M.) et Hall (E. M.). — *Arch. Path.*, 1928, 6, 1-25.
63. Calassou (Mlle). — Thèse pharm. Toulouse, 1928.
64. Callan et Henderson. — *Analyst.*, vol. 54, p. 650.
65. Calvet (F.) et Nino Enrique. — *Ann. Soc. Esp. Fis. Quim.*, 1934, 32, 678.
66. Campbel. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1900, 22, 307.
67. Capt et Benvegnin (L.). — *Loc. cit.*
68. Carodemas (C.), Cawananger (G. W.) et Niscoll (J.). — *J. Dairy Sc.*, 1929, 12, 379.
69. Carpentier (G.). — *Union Pharm.*, 1922, p. 228 et 257; 15 sept. 1924, nov. 1925, mars 1926.
70. Carpentier et Thomas. — *C. R.*, 1921, 173, p. 1082.
71. Carthy (M. J. Mac). — *L. Assoc. Official. Agr. Chem.*, 1933, 16, 333-334.
72. Castel (A.) et Astruc (H.). — *Loc. cit.*
73. Castiglioni (A.). — *Z. Anal. chem.*, 1934, t. 97, n°s 7-8, p. 270.
74. Cazeneuve (P.). — *Bull. Soc. chim.*, 1900, 23, p. 701.
75. Cawananger (G. X.), Nicoll (J.) et Carodemas (C.). — *Loc. cit.*
76. Chanoz. — *C. R. Soc. biol.*, 1927, t. XCVIII, p. 1539; 1928, t. XCVIII, p. 39-42; 1929, t. C, p. 347; 1929, t. I, p. 457; *Bull. Soc. chim. biol.*, t. XCVII, p. 1539.
77. Chanoz, Ponthier (P.) et Niel (R.). — *C. R. Soc. biol.*, 1933, 112-887-890.

78. Charrier (G.) et Beretta (R.). — *Loc. cit.*
79. Chatteyi (S. P.) et Henderson (J.). — *Indian Med. Gaz.*, 1928, 63, 620.
80. Chen (K. H.) et Kao (C. H.). — *J. Chinese chem. Soc.*, t. 3, n° 1, p. 22.
81. Cherbuliez (E.) et Ansbacher (S.). — *Loc. cit.*
82. Cherbuliez (E.). — *Helv. Chim. Acta*, 1920, 12, 920-921.
83. Chiaria (P.). — *Giorn. Pharm. Chim.*, 1929, 78, 530-533-535.
84. Chou (T. P.) et Adolph (W. H.). — *Loc. cit.*
85. Chytil (J.) et Dubsky (J.). — *Chem. Listy*, 1934, t. 28, n° 1, p. 67.
86. Clair (H. St.) et Funck (E. H.). — *Arch. Intern. Med.*, 1930, 45, 37-45.
87. Clarke et Jones. — *Analyst.*, 1929, 54, 333.
88. Cleve. — *J. fur pratik. chem.*, 1891, p. 864.
89. Cohen et Rosenheim. — *Zeits. anorg. chem.*, 1901, p. 280.
90. Collin (E. V. Mc) et Newell (J. M.). — *U. S. Dpt. Commerce Bureau Fisheries Investigations Rept*, 1931, 5, 169.
91. Comrie (A. A. D.). — *Analyst.*, 1935, 60, 32.
92. Conn (L. W.), Johnson (A. H.), Treller (A.) et Karpenko (V.). — *Ind. Eng. ch. analyt.* Edit., janv. 1935, t. 7, p. 15.
93. Cooper (S. R.) et Nichols (M L.). — *Am. Chem. Soc.*, 1925, t. XLVII, p. 1268.
94. Cope. — *Analyst.*, 1932, 57, 709.
95. Copenhaver (I. E.) et Culp (F. B.). — *I. Hame. Econ.*, 1935, 27, 308.
96. Cresti (E.). — *Deutsch. Chemisch. Gesell.*, 1878, t. X, p. 1099.
97. Crobst (R.). — *Arch. Exptl. Pharm.*, 1933, 169, 119-129.
98. Culp (F. B.), Remington (R. E.) et Ansbacher (S.). — *Loc. cit.*
99. Culp (F. B.) et Copenhaver (J. E.). — *Loc. cit.*
100. Cuny (L.). — *J. P. C.*, 1924, 7e série, t. 30, p. 240; *ibid.*, 1931, 8e série, t. 13, p. 513.
101. Cupta (J.) et Ray (P. R.). — *Mikrochem.*, 1935, t. 17, n° 1, p. 14-16.
102. Currie. — *Bioch. J.*, 1924, t. XVIII, p. 1224.
103. Czipke (Z.). — *Magyar Gyojyszeresztud Tarsasag Retesitoji*, 1933, 9, 437-444.
104. Dabbinian et Kankanian. — *Z. Anal. Chem.*, 1934, t. 99; nos 1-2, p. 29.

105. Dahl (C.). — *Zids. Kemi. Bergvesen*, 1927, 7, 8-10.
106. Dahle (C. D.) et Folker (L.). — *Ice cream trade J.*, 1931, 27, n° 12, 56-59.
107. David (M.) et Sisley (P.). — *Bull. Soc. chim. France*, 1930, t. 47, n° 10, p. 1118.
108. Davies (L.). — *J. Dairy research*, 1931, 3, 86-92.
109. — *Ibid.*, 1933, 4, 255.
110. — *Milk. Ind.*, 1933, 13, 55.
111. Davis (H. P.), Whitfield et Downs (P. A.). — *Milk. Dealer*, 1934, n° 2, 34; n° 3, 40; 1935, n° 4, 42.
112. Deborde. — *A. F. F.*, 1929, 22, n°s 247-248, p. 410.
113. Dehr (C. J.), Scott (E.) et Lowell. — *Vet. Alumin. quart.*, 1933, 20, 54-66.
114. Delepine. — *Bull. Sc. Pharm.*, 1908, p. 370.
115. — *Bull. Soc. chim.*, 1908, 4e série, L-III, p. 463.
116. Demoussy et Maquenne. — *C. R. Acad. Sc.*, 1919, 168, p. 489; *Bull. Soc. Chim.*, 1919, 14, 3.
117. Denigès. — *C. R. Acad. Sc.*, 1889, t. CVIII, p. 568, et *Traité de chim. anal.*, 1910, p. 72, 5e éd.
118. Denigès et Simonnot. — *Bull. Soc. pharm. Bordeaux*, août à sept. 1914, et *Ann. chim. anal.*, 1915, p. 198.
119. Denigès. — *C. R. Acad. Sc.*, 1932, 194, 895-897.
120. — *Bull. Soc. pharm. Bordeaux*, 1932, 70, 101.
121. — *Bull. Soc. pharm. Bordeaux*, 1933, 3, p. 175.
122. Derrien et Benoit. — *Loc. cit.*
123. Desgrez (Ch.). — Thèse Doct. Univ. Pharm., Paris, 1930.
124. Dick (J.) et Spacu (G.). — *Zeit. Anal. chem.*, 1927, t. 71, p. 185; *ibid.*, 1929, t. 78, p. 241.
125. Dietz (W. H.), Saywel et Robertson. — *J. Assoc. Official. Agr. Chem.*, 1934, 17, 290.
126. Ditt et Funk. — *Z. Anal. Chem.*, 1932, t. 93, n°s 7-8, p. 241-247; *ibid.*, t. 93, p. 1-20.
127. Dixon et Hoyle (J. C.). — *J. pharm.*, 1929, 35, 409, 415.
128. Donwell (A. M.). — *Am. Rev. Tuberc.*, 1932, 25, 252.
129. Drea (N. F.). — *J. Nutrition*, 1934, 8, 229.
130. Dry (J. T.) et Judd (F. S.). — *J. Lab. Chim. Med.*, 1935, 20, 609-615.
131. Dubsky (J. V.) et Bencko (V.). — *Loc. cit.*
132. Dubsky (J. V.) et Chytil. — *Loc. cit.*
133. Dubsky (J. V.) et Ertilek (J.). — *Z. Anal. Chem.*, 1934, 96, 412.

134. Duffour-Deffandre (Mme) et Roussel (G.). — *Soc. biol.*, 1931, t. I, p. 200.
135. Durst (G.). — *Melliands Textilber*, 1934, t. 15, n° 12, 568.
136. — *Melliands Textilber*, 1934, t. 15, p. 314.
137. Dutoit (P.) et Weisse (Von). — *J. Chim. Phys.*, 1911, 618.
138. Eicholtz (Fritz). — *Arch. Exptl. Path. med. pharmacol.*, 1930, 148, 319-376.
139. Elvehjem et Lindon. — *J. Biol. Chem.*, 1929, 81, p. 435.
140. Elvehjem et Hart (E. B.). — *J. Biol. Chem.*, 1929, 82, 473.
141. Elvehjem, Lindon et Peterson (W. H.). — *J. Biol. Chem.*, 1929, 82, 415.
142. Elvehjem, Steenbock (H.) et Hart (F. B.). — *J. Biol. Chem.*, 1929, 83, 27-34.
143. Emmerie (A.). — *Chem. Weekblad.*, 1930, t. 27, n° 39, 552.
144. Ernst Wilke-Dorpert et Murek (C.). — *Z. Anorg. Allgem. chem.*, 1930, 184, 121.
145. Ertilek (J.) et Dubsky (J. V.). — *Z. Anal. Chem.*, 1934, 96, 412-415.
146. Escot-Pozzi. — *C. R. Acad. Sc.*, 8 janv. 1910.
147. Etzel (G.) et King (C. S.). — *Ind. Chem.*, 1929, 19, 1004.
148. Evers (N.) et Haddock (L. A.). — *J. Pharm. Pharmacol.*, 1932, 5, 458-460; *Analyst.*, 1932, t. 57, n° 677, p. 495-499.
149. Farlane (Mac). — *Biol. J.*, 1932, XVII, 4, 1022.
150. Farlennod (J. G.). — *A. G. Brit.*, 17 mars 1927, 295-734.
151. Farrow (F. F.), Brownsett et Neale (S. M.). — *Loc. cit.*
152. Feigl (F.) et Kapulitzaz (H. J.). — *Mikrochem.*, 1930, t. 8, n° 11, p. 229.
153. Feigl (F.), Hirsch (G.) et Tamchyna. — *Mikrochem. Z.*, 1929, 10-20.
154. Feigl (F.). — *Z. Anal. Chem.*, 1928, 74, 380.
155. — *Ber. der deutsch. chem. Gesell.* (B.), 1923, t. 56, p. 2083.
156. Feigl (F.) et Krumholn (C.). — *Scientia Pharm.*, 1924, 51, 1920.
157. Fellenberg (Th. Von). — *Mitt. Lebensm. Hyg.*, 1932, 23, n°s 1-2, p. 70.
158. Fergusen (B.) et Ghee (J. L. M.). — *J. Eliska. Mitchell. Sc. Soc.*, 1933, 49, 18.
159. Feron et Lancien. — *C. R. Acad. Sc.*, 1934, t. 198, n° 7, p. 683.
160. Filhene. — *Deuts. Med. Wochenschr.*, 1896, 22, 145.
161. Finck (C. G.) et Rottman (F. A.). — *J. Dairy Sc.*, 1932, 15, 73.

162. Fischer et Leopoldi. — *Ange. Chem.*, 1934, 47, n° 6, p. 80; *Wiss. Veroffentlich Sc. Komzern*, 1933, 12, 44, 52.
163. Fischer (H.). — *Mikrochem.*, 1930, t. 8; n° 4, p. 319.
164. — *Angew. Chem.*, 1933 46, 442.
165. Flatow (L.). — *Biochem. Z.*, 1928, 194, 132.
166. Flinn et Inouye (J. N.). — *J. Am. Med. Assoc.*, 1928, 90, 1010.
167. Folcini (A. J.). — *Rev. centr. est. farm. bioquem.*, 1928, 17, 305.
168. Folker (E. I.) et Dahle (C. D.). — *Loc. cit.*
169. Fontès et Thivolle. — *Bull. Soc. Chim.*, avril 1923, p. 431.
170. Frei et Whicke (J.). — *Klin. Wochenschr.*, 1934, 10, 404-406.
171. Frémy. — *Encyclopédie*, t. IV, p. 53.
172. Frémy et Schoorl. — *In* thèse Guérithault, p. 83.
173. Frocrain et Lasausse. — *J. P. C.*, 1936, p. 84.
174. — *J. P. C.*, 1936, p. 77.
175. Fuchs (W.). — *Ind. Eng. Chem.*, 1935, 1099-1100.
176. Fuller (C. H. F.), Lampitt, Hugues et Bilham (P.). — *Analyst*, 1926, 51-327.
177. Fulton (C. C.). — *Am. Chem. J. Pharm.*, 1933, 25 et 62.
178. Fumakoschi (O.). — *Mem. Coll. Sci. Kyoto. Imp. Univ.*, 1929, A, 12, 155.
179. Funck et Ditt. — *Loc. cit.*
180. Funck (E. H.) et Saint-Clair (H.). — *Arch. Intern. mad.*, 1930, 45, 37-45.
181. Gascon (J.). — *Revue facultated scien. quim.*, 1928, 5, P.H.I., 41-72.
182. Gauthier (Cl.) et Ribard (R.). — *C. R.*, 198, 1934, 2026-2028.
183. Gazzi (V.). — *Ann. Chim. Appl.*, 1933, 23, 71.
184. Gensler (H. I.). — *J. Assoc. off. Agr. chem.*, 1931, 14, 142.
185. Gebach (W.) et Ruthard (K.). — *Beitr. Path. Anat.*, 1934, 92, 347.
186. Gebach (W.). — *Arch. Path. Anat.*, 1934, 294, 171; 1935, 295, 394.
187. — *Sitzler. Math. Naturew. Alt: layer. Akad. wiss. Munchen.*, 1933, n° 2, 315-316.
188. Gebhart et Sommer (H. H.). — *End. Eng. Chem. Analyts. Edit.*, 1931, t. 3, n° 1, p. 24-26.
189. — *J. Dairy Sc.*, 1932, 15, 42.
190. — *Ind. Eng. Chem. Anal. Edit.*, 1931, 3, 414.
191. Germuth (F.) et Mitchell (C.). — *Am. J. Pharm.*, 1929, 101, 46.

192. Ghee (J. L. Mc) et Fergusen (B.). — *Loc. cit.*
193. Giberton et Violle. — *Presse médicale*, 1929, 37, 943.
194. — *C. R.*, 1929, 188, 409-411.
195. — *Soc. biol.*, 1928, t. IV, p. 1723.
196. — *Soc. biol.*, 1928, t. IV, p. 1938.
197. Giuliani (G.) et Saccardi (P.). — *Bioch. terap. sperm.*, 1935, 22, 169-172.
198. Godden (Wm.). — *Agr. Progress.*, 1931, 8, 81-94.
199. Golse. — *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1933, I, p. 16.
200. Golse et Hugot. — *J. P. C.*, 1932, 16, 22-26.
201. Golse. — *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1933, t. I, p. 24-30.
202. — Thèse doct. sc., Bordeaux, 1933.
203. Gosselin et Guillemet. — *Loc. cit.*
204. Grendell (E.). — *Pharm. Weekblad.*, 1930, 67, 913-921.
205. — *Ibid.*, 1930, 67, 1052.
206. Grimmer (W.). — *Milchow. Forschr.*, 1934, 16, 436.
207. Gruzewska (Mme) et Roussel (G.). — *C. R. Soc. biol.*, 1936, t. XXX, p. 289; *ibid.*, 1935, p. 934.
208. Guérithault. — Thèse pharm. sup. Paris, 1927.
209. Guillemet (R.) et Schell (C.). — *C. R. Soc. biol.*, 3 juill. 1931, t. 107, n° 22, p. 1006.
210. — *Z. getride. u. Mulhen weiss*, 3 juill. 1931, n° 8, p. 158.
211. Guillemet. — *C. R. Soc. biol.*, 1931, 108, 32.
212. — *Ibid.*, 1932, 109, 652.
213. — *Ibid.*, 1932, 109, 221.
214. Guillemet et Gosselin. — *Soc. biol.*, 1932, 111, 41 et 733.
215. Guillemet. — *Ibid.*, 1932, t. 3, p. 31.
216. — *Ibid.*, 1932, t. 3, p. 39.
217. — *Ibid.*, 1933, t. 3, p. 1038.
218. Guillemet et Sigot. — *Ibid.*, 1933, t. 3, p. 1041.
219. Guillemet et Thivolle. — *C. R. Soc. biol.*, 1931, t. 108, n° 27, p. 30.
220. Guillemet. — *Bull. Soc. chim. biol.*, 1932, p. 1351.
221. Grunsteidl. — *Mikrochem.*, 1932, 12, 169-173.
222. Gurtmann et Marshall. — *Am. Chem. Soc.*, 1915, t. XXXVII, 16, p. 147.
223. Gutzeit (G.) et Monnier (R.). — *Helv. Chim. Acta*, 1933, 16, 233; *ibid.*, 1933, 16, 478.
224. Haase (M. L. W.). — *Z. Anal. Chem.*, 1929, LXX, p. 347.
225. — *Ibid.*, 1929, n^{os} 3-4, 78.
226. Haddock (L. A.) et Evens (N.). — *Loc. cit.*
227. Hahn (F. L.). — *Mikrochem.*, 1934, t. 14, n° 2, p. 280-282.

228. Hahn (F. L.) et Hartleb (E.). — *Zeit. f. Anal. Chim.*, 1927, p. 225.
229. Hall (E. M.) et Butt. — *Loc. cit.*
230. Hall (S. H.), Lythgoe (H. C.) et Berry (R. O.). — *Loc. cit.*
231. Hampp (H.). — *Allgm. Brauer u. Hoppen. Ztg.*, 1933, 73, 659-664.
232. Hanack (H.). — *Z. Unters. Lebensm.*, 1932, 59, 511-512.
233. Harry (R. G.). — *Analyst.*, 1931, t. 56, n° 668, p. 736.
234. Hart (E. B.) et Elvehjem. — *Loc. cit.*
235. Hart (E. B.), Elvehjem (C.) et Steenbock (M.). — *Loc. cit.*
236. Hartleb (E.) et Hahn (L.). — *Loc. cit.*
237. Haurowitz (F.) et Turnwald (H.). — *Z. Phys. chem.*, 1929, 181, 176.
238. Heide (C. V.) et Hennig (K.). — *Z. untersuch. Lebensm*, 1933, 66, 321; *ibid.*, 1933, 66, 341-348.
239. Hellwigg (A.) et Quam (C. N.). — *J. Biol. Chem.*, 1928, 78, 681-684.
240. Hellwigg (A.), Quam (C. N.) et Soboman (E. I.). — *Coe Coll. Cedar. Rapids. Iowa. Eng. Chem.*, 1928, 20, 930-931; *T. th. Am. Rept. N. y. State Assoc. Dairy and milk Inspectors*, 1933, 49-52.
241. Henderson (J.) et Chatteyi (S. P.). — *Loc. cit.*
242. Henderson et Callan. — *Loc. cit.*
243. Henler (F.) et Philippi (E.). — *Mikrochem.*, 1930, p. 241-242.
244. Hennig (K.) et Heide. — *Loc. cit.*
245. Herkel (W.). — *Beits. path. Anat.*, 1930, 85, 513-551.
246. Herkel (W.) et Schonheimer (R.). — *Klin. Wochenschr.*, 1930, 9, 1449.
247. — *Klin. Wochenschr.*, 1931. 10, 345.
248. Herman (J.). — *Eng. Mining. J.*, 1934, 135, 299-300.
249. Hernsler (F.) et Philippi (R.). — *Emich. Fets. chrift.*, 1930, p. 241.
250. Hesse, Supplée et Bellis. — *Loc. cit.*
251. Hieber (W.). — *Ber.*, t. 54, p. 902.
252. Hilmann (J. I.). — *T. th. am. Rept. N. y. Stat. Assoc. Dairy and milk. Inspectors*, 1933, 49-52.
253. Hirsch (G.), Feigl (F.) et Tamchyna (I.). — *Loc. cit.*
254. Hisashi Mandi. — *Acta Schol. Mad. Univers. Imp. Kyoto*, 1931, 14-163.
255. Hodges (A.) et Peterson (W. H.). — *J. Am. Diet. Assoc.*, 1931, 7, 6-16.
256. Hoyle (J. C.) et Dixon (W. E.). — *J. Pharmacol.*, 1929, 35. 409-415

257. Hughes (G.). — *J. Ind. Brewing.*, 1931, 37, 366.
258. Hughes (E. B.), Lampitt (H.), Bilham (P.) et Fuller (C. H. F.). — *Loc. cit.*
259. Hughes et Bouffard (E.). — *Loc. cit.*
260. Hughes (E.). — *Progress. Agric. vit.*, 1931, 95, 472-473.
261. Hughes (E.) et Titus. — *Kansas state Agr. Coll. J. Dairy Sc.*, 1929, 12, 90, 31.
262. Hugot (J.) et Golse (J.). — *Loc. cit.*
263. Hugot (J.). — Thèse doct. Univ. pharm. Bordeaux, 1932.
264. Hurd (L. C.) et Chambers (J. S.). — *Ind. Eng. chem. Anal. Edit.*, 1932, 4, 236-238.
265. Idoux. — *Brass. et Malt.*, 1931, 21, 198-201.
266. Ilroy. — *Analyst.*, 1934, 59, n° 695, p. 103.
267. Imbert et Pilgrain. — *Bull. Soc. chim.*, 1924, t. XXXV, p. 60 et 83.
268. Inouye (J. N.) et Flinn (F. B.). — *Loc. cit.*
269. Ishiman (S.). — *J. chem. Soc. Japan*, 1934, 55, 288-292.
270. Jablezynsky et Stankiewiez (W.). — *Roeniky. chem.*, 1927, 594-598.
271. Jackson (H. C.) et Roundy (Z. D.). — *Wis. Agr. Exptl. sta. Bull.*, 428; *Ann. Rept.*, 1932, 35, 1934.
272. James (S. O.) et Aoward Satterfield (G.). — *Loc. cit.*
273. Janiesck. — *Magyar. Gyapy tarsalay Ertesitojé*, 1929, 5, 317.
274. Johnson (A. H.), Conn (L. W.), Treller (A.) et Karpenko (V.). — *Loc. cit.*
275. Judd (F. S.) et Drys (T. J.). — *Loc. cit.*
276. Kalstrom (E. K.). — *Svensk. Farm. Tids.*, 1934, 38, 189.
277. — *Ibid.*, 1934, 5, 1920.
278. Kankanian et Dabbinian. — *Loc. cit.*
279. Kao (C. H.) et Chen (K. H.). — *Loc. cit.*
280. Kapulitzas (H. J.) et Etzel. — *Loc. cit.*
281. Karpenko (V.), Conn (L. W.), Johnson (A. H.), Trebler (A.). — *Loc. cit.*
282. Karstein (P.). — *Chem. Weekbl.*, 1933, t. 30; 1933, t. 3,
283. — *Pharm. Week.*, 1933, t. 70, p. 914.
284. Kbvetzer (Fr.) et Sampe (E.). — *Fortsch. Geb. Roentferst.*, 1933, 47, 352-357.
285. Kenjirostrogi. — *Bull. Inst. Phys. chem. Research, Tek.*, 1931, 10, 162.
286. Keruler (F.). — *Emich. Fetsch*, 1930, p. 241, 1908.
287. King (C. S.) et Etzel (G.). — *Ind. chem.*, 1927, 19, 1004.

288. Kirchoff et Ruthing (A.). — *Chem. Ztg.*, 1930, 54, n° 42, p. 403.
289. Kirchnoff (F.). — *Chem. Ztg.*, 1932, t. 56, n° 30, p. 296; *J. Amer. Chem. Soc.*, 1930, 52, 2222.
290. Knecht (E.). — *D. ch. G.*, 1908, t. XXI, p. 298.
291. Koblanski (A. G.). — *J. Prikl. Khim.*, 1934, t. 7, n° 6, p. 1081.
292. Koch (R.) et Stockhausen (F.). — *Wochen. Branerei*, 1921, t. 48, n°s 38-39; *ibid.*, p. 403, 419-422.
293. Kolthoff (F.). — *Chem. Ztg.*, 1932, t. 56, p. 296.
294. Komarowski (A. S.) et Poluetkow. — *Z. Anal. Chem.*, 1934, t. 26, p. 23.
295. — *J. Prikl. Klin.*, 1934, t. 7, p. 844.
296. Kon (S. K.). — *J. Dairy Research*, 1934, 5, 250.
297. Kondo (K.) et Mori (S.). — *J. Chem. Soc. Japan*, 1932, 53, 1190.
298. Korenmann (I. M.). — *Pharm. Centrahl.*, 1930, t. 71, 769-772.
299. — *Ibid.*, 1931, t. 72, n° 15, p. 225.
300. — *J. Khim. Promychl.*, 1931, t. 8, n° 3, p. 276.
301. — *Pharm. Zentr.*, 1932, t. 73, n° 47, p. 738.
302. — *Ibid.*, 1933, t. 74, 504.
303. — *Z. Anal. Chem.*, 1934, t. 99, n°s 11-12, p. 402.
304. — *Ibid.*, 1933, t. 95, p. 44-48.
305. Koremmann (J. M.). — *Mikrochemie*, 1931, t. 9, n° 3, p. 223.
306. Kraemer (W.). — *Z. Anal. chem.*, 1934, t. 97, 401.
307. Kraemer (W.), Mohr (W.) et Schroter (N.). — *Nolkein. Ztg.*, 1934, 48, 1054.
308. Kraemer (R.), Mohr (W.) et Schotu (N.). — *Molkerei. Ztg.*, 1934, 46, 1054.
309. Kraemer (R.) et Mohr, (W.). — *Molkerei. Ztg.*, 1932, t. 46, 29, p. 528.
310. Krauss (W. E.) et Washburn (R. G.). — *Ohio Agr. Exptl. sta. Bull.*, 1934, 352.
311. Krebs (H. A.) et Warburg (O.). — *Bioch. Ztg.*, 1927, 187, 255.
312. — *Ibid.*, 1927, 191, 143.
313. Krenn (J.). — *Proc. Worl. Dairy. Comp.*, 1934, sect. II, 171.
314. Krumhoin (E.) et Feigl (E.). — *Scientia Pharm.*, 1934, 5, 1920.
315. Kuras (M.) et Spacu (G.). — *Z. Anal. chem.*, 1935, t. 102, n°s 1-2, p. 24.

316. Kustenmacher (H.) et Berg (R.). — *Loc. cit.*
317. Labat. — *Gaz. des sc. méd. de Bordeaux*, 1908.
318. Lambert et Balthazar. — *Loc. cit.*
319. Lampitt (H.), Hughes (E. B.), Bilham (P.) et Fuller (C. H. F.). — *Analyst.*, 1926, 51, 327-335.
320. Lampitt (L. H.) et Sylvester (N. D.). — *Analyst*, 1935, 60, 376-382.
321. Lancien et Feron. — *C. R. Acad. sc.*, 1934, t. 198, n° 7, p. 683.
322. Laque (F. L.), Triller (H. A.) et Wesley (W. A.). — *Ind. Eng. chem.*, 1932, 24, 339.
323. — *Trans. Electrochem. Soc.*, 1932, 61, 17.
324. Lasausse et Frocrain. — *Loc. cit.*
325. Lasausse (E.), Bureau (Y.) et Renaud. — *Loc. cit.*
326. Lavoye. — *J. pharm. belge*, 1921, 3, n° 52, p. 889.
327. Leopoldi (G.) et Fischer (H.). — *Loc. cit.*
328. Lesne, Zizine (P.) et Briskas (J. B.). — *Loc. cit.*
329. Lindow et Elvehjem. — *Loc. cit.*
330. Lindow, Peterson et Steenbock. — *J. Biol. Chem.*, 1929, 84, 419.
331. Liorden (H.) et Chapmann (A. C.). — *Loc. cit.*
332. Lowell, Scott (E.) et Dehr (C. I.). — *Vet. Alumin. quart.*, 1933, 20, 54.
333. Lucas. — *Bull. Soc. Chim.*, 1898, 19, p. 815.
334. Lunde (W.). — *Z. tuberck.*, 1927, 48, 285-298.
335. Lithgoe (H. C.), Berry (B. O.) et Hall (S. H.). — *Loc. cit.*
336. Macarovici (C. C.) et Spacu (G.). — *Z. Anal. Chem.*, 1935, t. 102, n^{os} 9-10.
337. Mahr (C.). — *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 28 nov. 1935, t. 225, n° 4, p. 386.
338. Mangini (A.). — *Gazz. chim. Ital.*, 1931, 61-820.
339. Mankin (W. R.). — *J. Proc. Roy. N. S. Wale*, 1933, 66, 509-515.
340. Maquenne et Demoussy. — *Loc. cit.*
341. Marsais (P.). — *Rev. vitic.*, 1928, 68, 233.
342. Martin (F.) et Pinkes (A.). — *Chim. Indust.*, numéro spécial, mai 1927, 182.
343. Martini (A.). — *Ann. Ass. quim. Argentine*, 1928, 16, 117, 24.
344. — *Mikrochem.*, 1928, 6, p. 28-33; *Chem. Zeits.*, 1928, 1884.
345. — *Mikrochem.* (N. S.), 1930, 2, 143, 6.
346. — *Ibid.*, 1929, 7, 30-32

347. Mathieu (L.). — *Bull. Assoc. chim. Sucr. Dist.*, 1934, t. 15, p. 369.
348. Matthews (C. I.). — *J. Inst. Brewing*, 1929, 35, 181-188.
349. Mechinian (R. M.). — *J. Assoc. Off. Agr. chem.*, 1932, 15, 541-543.
350. Mehurin (R. M.). — *J. Assoc. off. Agr. chem.*, 1933, 16, 330.
351. Melnikov (H. N.). — *Z. Anal. chem.*, 1934, t. 99, nos 5-6, p. 182.
352. Melthing (J. P.). — *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 15 nov. 1935, 7, n° 6, p. 387.
353. Meunier (J.) et Saint-Laurent (Mlle G.). — *C. R.*, 1926, 183, 1311.
354. Mitchell et Germuth (E.). — *Am. J. Pharm.*, 1929, 101, 46-52.
355. Mohr (W.), Kramer (R.) et Schroter (M.). — *Loc. cit.*
356. Mohr (W.) et Kramer (R.). — *Loc. cit.*
357. Monnier (R.) et Gutzeit (G.). — *Helv. chim. Acta*, 1933, 16, 233; *ibid.*, 1933, 16, 478-486.
358. Montequi. — *Bull. Soc. pharm. Bordeaux*, 1923.
359. — *Arch. Soc. Esp. Fis. quim.*, 1927, t. 25, p. 52-76.
360. Morel (A.) et Policard (A.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1932, 51, 1125.
361. Mori (S.) et Kondo (K.). — *J. Chem. Soc. Japan*, 1932, 53, 1190.
362. Morrisson (D. B.) et Nosch (Th. P.). — *J. Biol. chem.*, 1930, 88, 497.
363. Mouzon. — *Presse médicale*, 1929, 358-359.
364. Muller (E.) et Takegani (S.). — *Z. Anal. chem.*, 1928, 73, 284-288.
365. Muller (J. A.). — *Apoth. Ztg.*, 1936, 50, 93-97.
366. Munro Fox (H.) et Ramage (H.). — *Nature*, 1930, 126, 682.
367. — *Proc. Roy. Soc. London*, 1931, 108 B, 157-173.
368. Murech (H. G.) et Wilke-Dorfert (Ernst). — *Loc. cit.*
369. Nachtigall (C.). — *Gas. u. Wasserfach.*, 26 nov. 1932, t. 75, n° 48, p. 941.
370. Neale (S. M.), Brownsett (Th.) et Farrow (F. F.). — *Loc. cit.*
371. Negresco (T.). — *J. chim. Phys.*, 1928, 25, 343-362.
372. Newell (I. M.) et Collin (E. V. Mc). — *Loc. cit.*
373. Nibbourn (N.). — *J. Install. Metall.*, 1934, 55, 403.
374. Nichiro Sarata. — *Japan., J. Med. Sc., II, Biochem.*, 1933, 2, 247-260.

375. Nichols (M. L.) et Cooper (S. R.). — *Loc. cit.*
376. Niel (R.), Chanoz et Ponthus (P.). — *Loc. cit.*
377. Nielsen (B.) et Anderson (G.). — *Loc. cit.*
378. Nino Enrique et Calvet (F.). — *Loc. cit.*
379. Niscool (J.), Cawananger (G. W.) et Carodemas (C.). — *Loc. cit.*
380. Nitardy (F. W.) et Bollheimer (F. C.). — *Loc. cit.*
381. Noch (P.) et Morrisson (D. B.). — *Loc. cit.*
382. Okac (A.). — *Z. anal. chem.*, 1932, 88, n° 3, p. 108.
383. Oshima (F.) et Schomheimer (R.). — *Univ. Freiburg. Z. physiol. chem.*, 1929, 180; *ibid.*, 1929, 252.
384. Oshima (F.) et Schomheimer (P.). — *Z. phys. chem.*, 1929, 180, 249.
385. Oshima (F.) et Siebelt (P.). — *Beitr. path. Anat.*, 1930, 84, 106-110.
386. Othaz (E.). — *Rev. Assoc. Med. Argent.*, 1934, 48, n° 336.
387. Otto (I. G.), Bishop (E. R.) et Baisden (L.). — *Loc. cit.*
388. Parravano (N.) et Pasta (A.). — *Gaz. chimica. ital.*, 1907, 37, 252-264.
389. Pasztor (I.) et Trambics (J.). — *Mezpgas dasagi Kutatasek*, 1935, 8, 73.
390. Pavolini (T.). — *Ind. Chim.*, juin 1933, 8, n° 6, p. 692-693.
391. Peterson (W. H.) et Hodges (A.). — *J. Am. Diet. Assoc.*, 1931, 7, 6-16.
392. Philippi (E.) et Henler (F.). — *Loc. cit.*
393. Philippi et Hernsler. — *Loc. cit.*
394. Pichier, Benedetti (A. A.) et Spikes (W. F. S.). — *Loc. cit.*
395. Pilgrain et Imbert. — *Loc. cit.*
396. Pilgrain, — *Bull. Ph. Sud-Est*, 1925, n° 20.
397. Pina de Rubies (S.) et Sirvent d'Argent. — *Ann. Soc. Esp. fis. quim.*, 1931, 29, 235-246.
398. Pinkes (A.) et Martin (F.). — *Loc. cit.*
399. Poirot. — *J. P. C.*, 1924, 7e série, t. XXX, p. 393.
400. Policard (A.) et Morel (A.). — *Loc. cit.*
401. Policard (A.). — *C. R. Soc. biol.*, 1933, t. 112, p. 1418.
402. Poluetkov (N. S.) et Komarowski (A. S.). — *Loc. cit.*
403. Ponthus (P.), Chanoz et Niel (R.). — *Loc. cit.*
404. Popps. — *Landw. vers. sta.*, 1931, III, 271-291.
405. Pozzi et Escot. — *Loc. cit.*
406. Quam (G. N.) et Hellwig (A.). — *Loc. cit.*
407. Quam (G. N.), Soboman (E. I.) et Helwig (A.). — *Loc. cit.*

408. Quam (G. N.) et Soboman (E. I.). — *Coc. Coll. Cedar. Rapids. Proc. Iowa. Acad. Sc.*, 1927, 34, 216-217.
409. Quam (G. N.). — *Proc. Iowa. Acad. Sc.*, 1929, 36, 261-262.
410. — *Ind. Eng. Chem.*, 1929, 21, 703-704.
411. — *Proc. Iowa. Acad. Sc.*, 1929, 36, 267-268.
412. Rabinovitch. — *J. of Biol. Chem.*, n° 100, 1933, p. 479.
413. — *Arch. Int. Med.*, 1933, 51, 143.
414. Rabinovitch et Ross (A.). — *J. of Biol. Chem.*, 1935, 111, n° 3, p. 803.
415. Ramage (H.) et Munro Fox (H.). — *Loc. cit.*
416. Ramage (H.) et Sheldon (S. H.). — *Bioch. J.*, 1931, 25, 1608, 27.
417. Ramage (H.), Sheldon (S. H.) et Sheldon (W.). — *Proc. Roy. Soc. London, B.*, 1933, 113, 308-327.
418. Ramage (H.) et Sheldon (J. H.). — *Quart. J. Med.*, 1935, 4, 121-129.
419. Ramage (H.). — *Nature*, 1926, 2701, 1930.
420. Ramage et Sheldon (J. H.). — *Biochem. Z.*, 1933, 27, 674-677.
421. Ramage (H.) et Sheldon (H.). — *Quart. J. Med.*, 1932, I, 135-139.
422. Ramsey (R. J.), Tracy (P. H.) et Ruche (H. A.). — *Agr. Exptl sta. Bull.*, 1933, 389, 579.
423. — *Ice Cream trade J.*, 1933, 29, n° 12, 40.
424. Rapt (L. de St-) et Bertrand (G.). — *C. R. Acad. sc.*, 1936, t. 203, p. 140; *J. P. C.*, 1937, t. XXV, p. 84.
425. Ray (P.). — *J. Med. Chem. Soc.*, 1928, 3, 118.
426. — *Z. anal. chem.*, 1929, 79, 94-101.
427. Ray (P.) et Cupta (J.). — *Loc. cit.*
428. Ray (P.) et Bosc (M.). — *Loc. cit.*
429. Rebella et Benedicente. — *Loc. cit.*
430. Rees (H. G.). — *Analyst.*, 1933, t. 58, n° 688, p. 384.
431. Reif (W.). — *Microchem.*, 1931, t. 9, n° 4, p. 424.
432. — *Z. Anal. chem.*, 1932, t. 88, n^{os} 1-2, p. 38.
433. Remington (R. E.), Ansbacher (S.) et Culp (F. B.). — *Loc. cit.*
434. Remington et Shiver (H. E.). — *J. Assoc. Official Agr. Chem.*, 1930, 13, 139-142.
435. Remy (E.). — *Z. Untersuch. Lebensm.*, 1931, 62, 513-516.
436. — *Z. Untersuch. Lebensm.*, 1932, 64, 545-548.
437. Renaud, Bureau (Y.) et Lasausse (E.). — *Loc. cit.*
438. Renz. — *Z. fur anorg.* ch., XXXVI, 1903, p. 100.

439. Ribéreau-Gayon (J.). — *A. F. F.*, 1930, t. 23, 1934, 345-346.
440. — *Rev. vitic.*, 1929, 71, 277-283; *A. F. F.*, 1930, 23, 535-544; *A. F. F.*, 1935, 28, 349-360.
441. Ricard (R.) et Gauthier (Cl.). — *Loc. cit.*
442. Richardson (F. W.). — *Analyst.*, 1930, 55, 323-.
443. Riley (J. L.) et Astin (S.). — *J. Chem. Soc.*, mars 1933, p. 314-315.
444. Riley. — *Ibid.*, juill. 1933, p. 895.
445. Ritter (W.) et Christen (M.). — *Schweiz. Milch. Ztg.*, 1925, 61, 23-24.
446. Rivas Goday (S.). — *Bol. Farm. Mil.*, 1933, t. 11, n°. 131, p. 369.
447. Robertson (P. D.), Saywell (L. G.) et Dietz (W. A.). — *Loc. cit.*
448. Robin. — *Trav. du Lab. Municipal de Paris*, cité par Kling et Lassieur.
449. Roldan (J.). — *Ann. Soc. Esp. fis. quim.*, 1931, t. 29, n° 280. p. 158.
450. Rolet (A.). — *Vie agr. et rur.*, 1934, 23, 345-346.
451. Roncato (H.) et Bassani. — *Loc. cit.*
452. — *Loc. cit.*
453. Rosenheim et Conn. — *Loc. cit.*
454. Ross (A.) et Rabinowitch (I. M.). — *Loc. cit.*
455. Rottman (F. A.) et Fink (C. G.). — *J. Dairy Sc.*, 1932, 73-86.
456. Roundy (Z. D.) et Jackson (H. C.). — *Loc. cit.*
457. Roussel (G.) et Duffou-Deffandre (Mme). — *Loc. cit.*
458. Roussel (G.) et Gruzewska (Mme). — *Loc. cit.*
459. Ruche (H. A.), Ramsey (R. J.) et Tracy (P. H.). — *Loc. cit.*
460. — *Loc. cit.*
461. Ruthard (K.) et Gebach. — *Loc. cit.*
462. Ruthing (A.) et Kirchnoff. — *Loc. cit.*
463. Sabatier (P.). — *Bull. Soc. chim.*, 1894, 11, p. 684.
464. Saccardi (P.) et Giuliani (G.). — *Biochem. Therap. sper.*, 22, 169-72.
465. Saint-Laurens (Mlle) et Meunier (G.). — *Loc. cit.*
466. Sampe (E.) et Kbvetzen. — *Loc. cit.*
467. Saywell (L. G.) et Remington (E.). — *J. Assoc. official. Agr. Chem.*, 1930, 13, 129-132.
468. Schell (C.) et Guillemet (R.). — *Loc. cit.*
469. Schiellich. — *Deut. Mahr. Rudsc.* 1932, 19, 150.
470. Schinichi Okajini. — *Acto. Schol. Med. Univ. Imp. Kyoto*, 1931, 14, 88-92.

471. Schiotu (N.), Mohr (W.) et Kraemer (R.). — *Loc. cit.*
472. Schneider (F.) et Whitmore (W. F.). — *Mikrochem.*, 1932, 12, 169-173.
473. Schönheime et Oshima. — *Hoppe Syler Z.*, 1929, t. CLXXX, p. 249.
474. Shönheimer (R.) et Herkel (V.). — *Loc. cit.*
475. Schoorl (N.) et Begemann (H.). — *Loc. cit.*
476. Schoorl. — *Chem. Week.*, 28 mai 1932, t. 29, n° 22, p. 338.
477. Schoorl et Fremy. — *Loc. cit.*
478. Schroter (N.), Mohr (W.), et Kraemer (R.). — *Loc. cit.*
479. Schulze (H.). — *Allgem. Brauer. u. Hoppen. Ztg.*, 1932, 72, 1112.
480. Scott (N.), Lowell et Dehr. — *Loc. cit.*
481. Sheldon (J. H.) et Ramage (H.). — *Loc. cit.*
482. Sheldon et Ramage (H.) et Sheldon (W.). — *Loc. cit.*
483. Sheldon (J. H.), Ramage (H.) et Sheldon (J. H.). — *Loc. cit.*
484. Shikata (M.), Tachi (I.) et Nozaki (N.). — *Men. Coll. Ag. Kyoto*, 1927, 49-57.
485. Shikata (M.), Tachi (I.) et Josukoki (N.). — *J. Agr. chem. Soc. Japan.*, 1934, 10, 368-378.
486. Shiver (H. E.) et Remington (E.). — *Loc. cit.*
487. Siebelt (P.) et Oshima (F.). — *Loc. cit.*
488. Sigot et Guillemet. — *Loc. cit.*
489. Simonnot et Denigès. — *Loc. cit.*
490. Sirvent d'Argent (C.) et Pina de Rubies (S.). — *Loc. cit.*
491. Sisley (M. P.) et David (M.). — *Loc. cit.*
492. Soboman (E. I.), Quam (G. N.) et Hellwig (A.). — *Loc. cit.*
493. Soboman (E. I.) et Quam (G. N.). — *Loc. cit.*
494. Sommer (H. H.) et Gebhardt (H. I.). — *Loc. cit.*
495. Spacu (G.) et Kubas (M.). — *Loc. cit.*
496. Spacu (G.) et Macarovici (C. C.). — *Loc. cit.*
497. Spacu (G.). — *Zeit. Anal. ch.*, 1925, t. LXVII, p. 31, *in Bull. Soc. chim.*, déc. 1925.
498. Spacu (G.) et Sugius (G.). — *Zeit. Anal. Chem.*, 1929, 78, 328-334.
499. Spacu (G.). — *Bull. Soc. sc. de Cluj.*, 1922, p. 284, t. 7.
500. — *Ibid.*, 1922, p. 286, 5.
501. — *Ibid.*, 1922, p. 352, 11.
502. — *Zeit. Anal. Chem.*, 1925, t. 67, p. 27 et 31.
503. Spacu (G.) et Spacu (P.). — *Ibid.*, 1934, t. 97, n°s 3-4, p. 99, 102.
504. Spacu (G.) et Dick (J.). — *Loc. cit.*

505. Spikes (W. F. S.), Benedetti (A.) et Pichier. — *Loc. cit.*
506. Stankiewiez (W.) et Jablezynsky (K.). — *Loc. cit.*
507. Starnotti (C.). — *Arch. farmacol. sper.*, 1928, 45, 113-132.
508. Steenbock (H.), Elvejehm et Hart (F. B.). — *Loc. cit.*
509. Steenbock (H.), Lindow et Peterson. — *Loc. cit.*
510. Steliem Augusti. — *Mikrochem.*, 1935, 17, 118, 26.
511. Stephani (Th.). — *Rev. tuberc.*, 1928, 9, 884; *Rev. hyg. prév.*, 51, 860.
512. Stochausen (F.) et Koch (R.). — *Loc. cit.*
513. Sughi (G.) et Spacu (G.). — *Loc. cit.*
514. Sullivan (B.). — *Cereal Chemistry*, 1933, 10, 503-514.
515. Sumegi (I.). — *Franckfent. Z. Path.*, 1933, 44, 490-507.
516. Supplée, Hesse et Bellis. — *Loc. cit.*
517. Sylvester (N. D.) et Lampitt (L. H.). — *Loc. cit.*
518. Szebelledy (L.). — *Z. Anal. Chem.*, 1928, 75, 167-168.
519. Tachi (I.) et Shikata (M.) et Nozak (N.). — *Loc. cit.*
520. Tamchyna (I.) et Feigl (F.) et Hirsch (G.). — *Loc. cit.*
521. Tamchyna (I. V.). — *Chem. listy*, 1930, 24, 31-34.
522. Tartarini (G.). — *Gaz. Chim. Ital.*, 1933, t. 63, n° 9, p. 597.
523. Tassily. — *Bull. Soc. chim.*, 1913, 13, p. 815.
524. Taurins (G.). — *Z. Anal. Chem.*, 1934, t. 97, n°s 1-2, p 27-36.
525. Tettamanzi (A.). — *Ind. Chimica*, mai 1934, t. 9, n° 5, p. 609.
526. Thivolle et Fontès. — *Loc. cit.*
527. Thivolle et Guillemet. — *Loc. cit.*
528. Thomas et Carpentier. — *Loc. cit.*
529. Titus (R. W.) et Hughes (J. S.). — *Loc. cit.*
530. Tompsett. — *Biochemical. J.*, 1934, t. XXVIII, p. 2088.
531. Toun (O.). — *Pharm. Zentral.*, 1933, 74, 53-54.
532. Tracy (P. H.), Ramsey (J.) et Ruche (A.). — *Loc. cit.*
533. Trambies (J.) et Pasztor (I.). — *Loc. cit.*
534. Triller (H. A.), Wesley (W. A.) et Laque (F. L.). — *Loc. cit*
535. Turner (A. H.). — *Chem. Eng. mining. Rev.*, 1928, 20, 361, 3.
536. Turnwald (H.) et Haurowitz (F.). — *Loc. cit.*
537. Ulhenbuth. — *Chem. Zeit.*, 1910.
538. Valaignié et Aloy. — Voir Aloy.
539. Viala (G.) et Marsais (P.). — *Loc. cit.*
540. Violle et Giberton (A.). — *Loc. cit.*
541. Votchal (B.). — *Khim. Farm.*, 1932, 424-428.
542. Waal (H. L. de). — *Am. Univ. Stellen bisch.*, 1932, 10-A; 1650.
543. Warburg (O.) et Krebs (H. A.). — *Loc. cit.*

544. Weisse (Von) et Dutoit (P.). — *J. Chim. Phys.*, 1911, 618.
545. Wesley (W. A.), Triller (H. H.) et Laque (F. L.). — *Loc. cit.*
546. Wichman (H. I.). — *J. Assoc. official. Agr. chem.*, 1933, 16, 321-324.
547. Wicke (I.) et Frei (W.). — *Klin. Wochenschr.*, 10, 1934, 404-406.
548. Wiegand (J. A.). — *Chem. Weekblad*, 27 mai 1933, t. 30, n° 14, p. 262.
549. Whitfield (B. H.), Davies (H. P.) et Downs (P. A.). — *Loc. cit.*
550. Whitmore (W. F.) et Schneider (F.). — *Loc. cit.*
551. Williams (W.). — *J. Dairy Research*, 1931, 3, 93, 100.
552. Yamamuro (G.). — *Sc. i. Kwai med. J.*, 1931, 50, n° 9, 118-130.
553. Yosukaki (N.), Shikata (M.) et Tachi (I.). — *Loc. cit.*
554. Zbinden (C.). — *Lait*, 1931, 11, 114-123.
555. — *Ibid.*, 1932, t. 12, n° 116, p. 481.
556. — *Soc. chim. biol.*, 1931, p. 481.
557. — *C. R.*, 1930, 190, 173.
558. Zizine (P.), Lesne et Briskas (J. B.). — *Loc. cit.*

TABLE DES MATIERES

Pages

I. — *Introduction* 9

II. — *Les micro-réactions du cuivre* 11

1. Détection par les méthodes physiques 12
2. Détection par les méthodes physico-chimiques .. 15
3. Détection au moyen des réactifs minéraux :
   a) donnant des colorations 15
   b) donnant des précipités 17
4. Détection avec les réactifs organiques :
   a) donnant des colorations 19
   b) donnant des précipités 23

III. — *Purification des réactifs* 30

IV. — *Matériel* 35

V. — *Méthodes de destruction* 37

VI. — *Méthodes de séparation* 40

VII. — *Méthodes de dosage* 43

VIII. — *Examen des excrétas* 56

A. Destruction de l'urine 56
B. Destruction des matières fécales 62

IX. — *Cuivre capillaire* 68

X. — *Etude des facteurs conditionnant l'excrétion du cuivre* 70

XI. — *Bilan cuivrique* 78

A. Alimentation du sujet 78
B. Délimitation des excrétas se rapportant à la période d'épreuve 79

XII. — *Destruction des aliments* 81

XIII. — *Etude de la localisation du cuivre chez l'animal normal intoxiqué* 88

Conclusions 97

Index bibliographique 99

20.053. — Bordeaux, Impr. Centrale Delmas, 6, pl. St-Christoly. — 193